

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANI SALVINI RAMADA

DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA AVALIAR A POTÊNCIA
NEUTRALIZANTE DE SORO ANTILOXOSCÉLICO DE USO TERAPÊUTICO

CURITIBA
2012

JULIANI SALVINI RAMADA

DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA AVALIAR A POTÊNCIA
NEUTRALIZANTE DE SORO ANTILOXOSCÉLICO DE USO TERAPÊUTICO

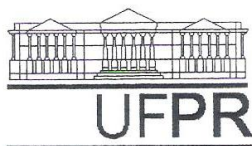
Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre do Programa de
Pós-graduação em Processos Biotecnológicos do
Setor de Tecnologia da Universidade Federal do
Paraná.

Área de concentração: Saúde Animal e Humana.

Orientador (a): Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga

Co-orientadores: Dr^a. Juliana Ferreira de Moura
Dr. João Carlos Minozzo

CURITIBA
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia
Setor de Tecnologia

RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos dezesseis dias do mês de março de 2012, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Sexagésima Terceira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Profª Drª Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG), Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), e Profª Drª Larissa Magalhães Alvarenga (UFPR - orientadora da dissertação).

Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Juliani Salvini Ramada** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: “ **Desenvolvimento de Ensaio *in vitro* para Avaliar a Potência Neutralizante de Soro Antiloxoscélico de Uso Terapêutico**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profª Drª Liza Figueiredo Felicori Vilela, Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe e Profª Drª Larissa Magalhães Alvarenga declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 16 de Março de 2012.

Profª Drª Liza Figueiredo Felicori Vilela

Profª Drª Luciana P S Vandenberghe

Profª Drª Larissa Magalhães Alvarenga

Dedico este trabalho aos meus amados e queridos pais,
Aluísio e Eliane, e ao meu irmão Jonatas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em todos os momentos da minha vida esteve presente, me conduzindo e apontando os caminhos pelos quais tenho trilhado. Sempre me abençoando e dando forças para vencer.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais, Aluísio Derossi Ramada e Eliane Ramada e ao meu irmão Jonatas Ramada, pelo amor incondicional, carinho, incentivo constante, compreensão nos momentos difíceis e de ausência, sorriso amigo diante dos obstáculos e por estarem sempre ao meu lado mesmo que distante. Amo vocês!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga, pela orientação, atenção, paciência, confiança depositada, presteza, e boa vontade na realização deste trabalho. Obrigada por tudo professora!

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Juliana Ferreira de Moura, pelo auxílio e pelas sugestões sempre pertinentes.

As amigas do *Limq* (Laboratório de Imunoquímica), Alessandra Becker, Carine Lima, Camila Zanatta, Rafaela Fogaça, Ana Garcia, Katlin Rech, Roberta Hirano, Sabrina Karim e Aline Zorzetto, por todo apoio, pois sempre estiveram à disposição para ajudar e não poderia deixar de agradecer pelos momentos inesquecíveis de descontração. Obrigada amigas, vocês são demais!

Aos colegas do curso de mestrado e doutorado em Processos Biotecnológicos pela solidariedade, incentivo e carinho.

Aos meus irmãos em Cristo, pelas orações e palavras construtivas que certamente me deram sustentação e ânimo para prosseguir.

Ao Prof. Dr. Juarez Gabardo pelos esclarecimentos em Estatística e contribuição nas análises dos resultados e pelo bom humor com que sempre me recebeu.

A todos os funcionários do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná, envolvidos direta ou indiretamente, aqui representados pelo Prof. Dr. João Carlos Minozzo eu agradeço por toda a cooperação e doação dos venenos e antivenenos usados para o desenvolvimento do trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, em especial, a Prof^a. Dr^a. Vanette Thomaz Soccol por disponibilizar o sintetizador

automático para confeccionar as membranas de *SPOT* imprescindíveis a realização deste projeto.

Ao Dr. Carlos Chávez Olórtégui e toda equipe do Laboratório de Imunoquímica de Toxinas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela síntese química dos peptídeos solúveis e esclarecimentos fundamentais da técnica de *Spot synthesis*.

À Fundação Araucária e a Capes pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca por terem acolhido o convite para avaliar este trabalho, muito me honra suas participações.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

Pegadas na Areia

"Esta noite eu tive um sonho...

*Sonhei que caminhava pela praia, acompanhada do Senhor,
e que na tela da noite estavam sendo retratados os meus dias.*

*Olhei e vi que cada dia que passava no filme da minha
vida, surgiam pegadas na areia, uma minha e outra do Senhor.
Assim continuamos andando, até que todos os meus dias se acabaram.*

Então parei e olhei para traz.

Reparei...

*Em certos lugares havia apenas uma pegada e esses lugares
coincidiam justamente com os dias mais difíceis da minha vida,
os dias de maior angústia, de maior medo de maior dor...*

Perguntei então ao Senhor:

*"Senhor, tu me disseste que estarias comigo todos os dias da
minha vida e eu aceitei viver contigo, mas por que tu me deixaste
nos piores dias de minha vida? "*

E o Senhor respondeu:

"Meu filho eu te amo.

*Eu disse que estaria contigo por toda a tua caminhada e que não
te deixaria um minuto sequer, e não te deixei...
Os dias que tu viste apenas uma pegada na areia,
foram os dias que te carreguei..."*

Margaret Fishback Powers

RESUMO

O loxoscelismo é uma síndrome necrótico-hemolítica causada por acidentes com pequenos aracnídeos, popularmente chamados de aranhas marrons, pertencentes ao gênero *Loxosceles*. Os acidentes representam um importante problema de saúde pública na América do Sul, onde predominam as espécies *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. A terapia, ainda controversa, apresenta diversos protocolos, sendo o soro antiveneno o único tratamento específico. Sua eficácia (potência) é determinada pela capacidade de neutralização do efeito dermonecrotico do veneno (*L. intermedia*) através de testes em coelhos, processo indispensável na liberação para uso terapêutico. Estes procedimentos são trabalhosos, demorados e sacrificam grande número de animais. Assim, o presente estudo teve como objetivos propor e desenvolver métodos *in vitro* para auxiliar na qualificação de soros antiloxoscélicos de equídeos hiperimunes. A técnica de ELISA foi empregada, na qual soros de diferentes potências, previamente qualificados *in vivo*, foram testados frente a diversos antígenos (*pool* de venenos, *L. intermedia* e/ou proteína dermonecrotica recombinante LiD1). No entanto, não foi possível estabelecer uma relação direta entre títulos obtidos pelo método e a potência neutralizante dos soros. Optou-se pelo mapeamento e estudo de epitopos de toxinas dermonecroticas usando o método de *Spot*, no qual membranas contendo peptídeos que cobrem toda a sequência de aminoácidos da principal toxina (fosfolipase-D) representativa de cada um dos venenos das três espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) foram testadas frente aos soros de diferentes potências. Os soros reconheceram epitopos de diferentes regiões das proteínas, além disso, foi visto que o reconhecimento de alguns epitopos era recorrente apenas em soros de alta potência quando testados em elevada diluição. Com base nesses resultados, dois peptídeos (5 e 7) foram selecionados, sintetizados, acoplados à albumina bovina sérica (BSA) e utilizados em um teste *in vitro* no formato de ELISA indireto. Diferentes condições foram testadas, nas quais a composição (Pep5-BSA, Pep7-BSA ou PeP5+7-BSA), a concentração de antígenos nas placas, assim como a diluição dos soros foram variadas. A melhor condição encontrada para a qualificação dos soros, ou seja, na qual houve distinção estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as amostras de alta e baixa potência foi a utilização do peptídeo 5 na concentração de 25 µg/mL e os soros em diluição 1:1000. Os resultados obtidos permitem sugerir que o teste ELISA usando epitopos sintéticos como antígeno pode ser usado na avaliação da potência neutralizante de antivenenos, pois a utilização de peptídeos sintéticos permitiu a correlação da reatividade dos soros apresentada no imunoensaio com o seu potencial neutralizante.

Palavras-chave: *Loxosceles* sp., antivenenos, mapeamento de epitopos, peptídeos sintéticos.

ABSTRACT

Loxoscelism is a necrotic-hemolytic syndrome caused by accidents with small arachnids, popularly known as brown spiders, belonging to the genus *Loxosceles*. The accidents represent a major public health problem in South America, where the predominant species are *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*. Therapy, although controversial, has several protocols and the antivenom serum is the only specific treatment. Its effectiveness (potency) is determined by the capacity of neutralizing the dermonecrotic effect of the venom (*L. intermedia*) which is evidenced through tests in rabbits, an essential process to release the serum for therapeutic use. These procedures are laborious, time consuming and a large number of animals are sacrificed. Thus, the aims of this study are to propose and develop *in vitro* methods to assist in qualifying anti-loxoscelic equine hyperimmune sera. The ELISA technique was employed, in which sera of different potency, previously qualified *in vivo*, were tested against various antigens (*pool* of venoms, *L. intermedia* and / or LiD1 recombinant dermonecrotic protein). However, it was not possible to establish a direct relation between titers obtained by the method and the neutralizing potency of the sera. We chose for the mapping and study of the epitopes of dermonecrotic toxins using the *Spot* method, in which membranes containing peptides covering the entire amino acid sequence of the major toxin (phospholipase-D) representative of each of the venoms of the three species *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*) were tested against sera of different potencies. The sera recognized epitopes from different regions of the proteins, in addition, it was found that the recognition of some epitopes was recurring only in high potency serum when tested in high dilution. Based on these results, two peptides (5 and 7) were selected, synthesized, coupled to bovine serum albumin (BSA) and used in an *in vitro* assay with an indirect ELISA format. Different conditions were tested, in which the composition (Pep5-BSA, Pep7-BSA or PeP5+7-BSA), the antigen concentration in the plates, as well as the dilution of the sera were varied. The best condition found for the qualification of the sera, or in which distinction was statistically significant ($p < 0.05$) between samples with high and low potency, was the use of the peptide 5 at a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ and sera at 1:1000 dilution. The results obtained allow us to suggest that the ELISA test using synthetic epitopes as antigens can be used in the evaluation of the neutralizing potency of antivenoms, because the use of synthetic peptides has allowed the correlation of the reactivity of sera presented in the immunoassay with its neutralizing potential.

Keywords: *Loxosceles* sp., antivenom, epitope mapping, synthetic peptides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DAS ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	21
FIGURA 2 - DIMORFISMO SEXUAL DAS ARANHAS.....	22
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> DE IMPORTÂNCIA MÉDICA.....	23
FIGURA 4 - MAPAS DA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> POR MUNICÍPIO DO ESTADO DO PARANÁ – BR.....	26
FIGURA 5 - LESÃO CAUSADA PELA PICADA DE ARANHA MARROM (<i>Loxosceles</i> sp.).....	28
FIGURA 6 - SEQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS DE 15 AMINOÁCIDOS SINTETIZADOS PELO MÉTODO SPOT SÍNTESE.....	47
FIGURA 7 - INSTRUMENTO BIOANALÍTICO INTAVIS AG.....	48
FIGURA 8 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS VENENOS.....	55
FIGURA 9 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E VENENO.....	66
FIGURA 10 - REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE TRÊS PROTEÍNAS DERMONECRÓTICAS TESTADOS COM SOROS ANTILOXOSCÉLICOS.....	72
FIGURA 11 - REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS E SINTETIZADOS EM NOVA MEMBRANA DE CELULOSE.....	74
FIGURA 12 - ALINHAMENTO DAS TRÊS PROTEÍNAS ESTUDADAS.....	77
FIGURA 13 - ALINHAMENTO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS ESTUDADAS.....	78
FIGURA 14 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS ANALISADAS E O POSICIONAMENTO DOS PEPTÍDEOS REATIVOS.....	80
FIGURA 15 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E PEPTÍDEOS CARREADOS.....	92
FIGURA 16 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E ANTÍGENOS BRUTOS.....	95
FIGURA 17 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS ANALISADAS E DISTRIBUIÇÃO DE CARGAS DOS AMINOÁCIDOS DO PEPTÍDEO 5.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PLANO DE IMUNIZAÇÃO DE BASE PARA EQUINOS NO CPPI...	42
TABELA 2 - PLANO DE REIMUNIZAÇÃO PARA EQUINOS NO CPPI.....	43
TABELA 3 - RELAÇÃO DOS SOROS FORNECIDOS PELO CPPI USADOS NOS EXPERIMENTOS.....	44
TABELA 4 - SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS USADAS NO MAPEAMENTO DOS EPITOPOS CONTINUOS.....	46
TABELA 5 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM O <i>POOL</i> DE VENENOS	57
TABELA 6 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM VENENO DE <i>L. intermedia</i>	61
TABELA 7 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DOS TESTES DE ELISA COM <i>POOL</i> DE VENENOS E DE <i>L. intermedia</i>	64
TABELA 8 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>LiD1</i>	68
TABELA 9 - SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS REATIVOS SELECIONADOS ..	73
TABELA 10- ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS REATIVOS SELECIONADOS	75
TABELA 11- HOMOLOGIA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS SELECIONADAS	79
TABELA 12- EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM OS DIFERENTES PEPTÍDEOS	89

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - NÚMERO DE ACIDENTES POR ARANHA MARROM NO ESTADO DO PARANÁ.....	25
GRÁFICO 2 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTE AOS TRÊS VENENOS.....	56
GRÁFICO 3 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO FATOR 1 (SOROS).....	58
GRÁFICO 4 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO.....	59
GRÁFICO 5 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTE AO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	60
GRÁFICO 6 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO FATOR 1 (SOROS).....	62
GRÁFICO 7 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO.....	63
GRÁFICO 8 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E VENENO.....	65
GRÁFICO 9 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTE A PROTEÍNA RECOMBINANTE LiD1.....	67
GRÁFICO 10 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO FATOR 1 (SOROS).....	69
GRÁFICO 11 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO.....	70
GRÁFICO 12 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM OS PEPTÍDEOS NÃO CARREADOS.....	82
GRÁFICO 13 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM DIFERENTES MOLÉCULAS CANDIDATAS AO CARREAMENTO.....	83
GRÁFICO 14 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM MOLÉCULA CARREADORA - BSA.....	84
GRÁFICO 15 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEOS CARREADOS A BSA.....	85
GRÁFICO 16 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEO 5 CARREADO A BSA.....	86

GRÁFICO 17 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEOS CARREADOS A BSA.....	87
GRÁFICO 18 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEOS CARREADOS A BSA.....	88
GRÁFICO 19 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO.....	90
GRÁFICO 20 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO.....	91
GRÁFICO 21 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEO 5 CARREADO A BSA.....	93
GRÁFICO 22 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTE AOS VENENOS E A PROTEÍNA RECOMBINANTE LiD1.....	94
GRÁFICO 23 - TÍTULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO 5 FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS.....	96
GRÁFICO 24 - REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO 5 FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS.....	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A, Ala	Alanina
AFC	Adjuvante de Freund completo
AFI	Adjuvante de Freund incompleto
A1H-LoxGa	Proteína dermonecrótica de <i>L. gaucho</i>
ANOVA	Análise de variância
AP	Alta potência
BP	Baixa potência
BSA	Albumina bovina
C, Cys, Cis	Cisteína
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
D, Asp	Ácido aspártico
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N-dimetilformamida
DMN	Dose mínima necrosante
E, Glu	Ácido glutâmico
ECL	<i>Electrochemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
F, Phe, Fen	Fenilalanina
Fc	Fração constante de imunoglobulina
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonil
FV	Fonte de variação
G, Gly, Gli	Glicina
GL	Grau de liberdade

H, His	Histidina
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
h	Horas
I, ILE	Isoleucina
IgG	Imunoglobulina G
K, Lys, Lis	Lisina
kDa	Quilo Dalton
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
L, Leu	Leucina
<i>Lg</i>	<i>Loxosceles gaucho</i>
<i>Li</i>	<i>Loxosceles intermedia</i>
LiD1	Proteína dermonecrótica 1 de <i>Loxosceles intermedia</i>
<i>LI</i>	<i>Loxosceles laeta</i>
M, Met	Metionina
M	Mol
mAb 12	Anticorpo monoclonal que reconhece os venenos de <i>Li</i> , <i>Lg</i> e <i>LI</i>
mg	Miligrama
Mg ⁺²	Íon magnésio
mL	Mililitro
MM	Massa molecular
mM	Milimolar
N, Asn	Asparagina
nm	Nanômetros
OMS	Organização mundial da saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
OVA	Ovalbumina
P, Pro	Prolina

PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Tampão fosfato salino com detergente Tween 20
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pep5-BSA	Peptídeo 5 carreado a albumina bovina
Pep7-BSA	Peptídeo 7 carreado a albumina bovina
Pep5+7-BSA	Peptídeos 5 e 7 carreados a albumina bovina
PI	Pré-imune
pI	Ponto isoelétrico
PMN	Polimorfonucleares
Q, Gln	Glutamina
R, Arg	Arginina
S, Ser	Serina
SAAR	Soro antiaracnídico
SALOX	Soro antiloxoscélico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida
SINAN	Sistema nacional de notificações de agravos
SMases-D	Esfingomielinase-D
SMase I	Esfingomielinase-D de <i>L. laeta</i>
SMcc	<i>sulfosuccinimidyl 4 - (N-maleimidomethyl) ciclohexano-1-carboxilato</i>
SPFS	Síntese peptídica em fase sólida
SVLg	Solução veneno <i>L. gaucho</i>
SVLi	Solução veneno <i>L. intermedia</i>
SVLI	Solução veneno <i>L. laeta</i>
T, Thr	Treonina
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline</i> com detergente Tween 20

Teste F	Teste fatorial
TFA	Ácido trifluoroacético
TsII,TsIV,TsVII	Toxinas escorpiônicas
UA	Unidade antinecrosante
V, VAL	Valina
W, Trp, Tri	Triptofano
Y, Tyr, Tir	Tirosina
µg	Microgramas
µL	Microlitros
°C	Grau Celsius
%	Por cento
<	Menor
≥	Maior ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 ARANHAS.....	20
2.1.1 ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	21
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	24
2.3 LOXOSCELISMO.....	27
2.4 VENENO E MECANISMO DE AÇÃO.....	29
2.5 TRATAMENTOS DO LOXOSCELISMO.....	33
2.6 PRODUÇÃO DE ANTIVENENOS.....	35
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 VENENOS.....	41
4.2 ANTIVENENOS.....	42
4.3 TESTE DE POTÊNCIA “ <i>in vivo</i> ”.....	44
4.4 ELISA INDIRETO COM VENENOS.....	45
4.5 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS DE CELULOSE.....	45
4.6 IMUNOENSAIOS COM PEPTÍDEOS LIGADOS À MEMBRANA DE CELULOSE.....	48
4.6.1 REGENERAÇÃO DA MEMBRANA.....	49
4.7 SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS.....	49
4.8 ELISA COM PEPTÍDEOS SOLÚVEIS.....	51
4.9 CARREAMENTO DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS A BSA.....	51
4.10 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO.....	52

4.11 ELISA PARA TITULAR ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO.....	53
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4.13 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DOS VENENOS.....	55
5.2 ELISA INDIRETO COM VENENOS.....	56
5.3 MAPEAMENTO DE EPITOPOS DAS PROTEÍNAS DERMONECRÓTICAS.	71
5.4 CONFIRMAÇÃO DOS EPITOPOS REATIVOS.....	74
5.5 ESTUDO E LOCALIZAÇÃO DOS EPITOPOS REATIVOS.....	76
5.6 SÍNTESE QUÍMICA E ACOPLAMENTO DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS.....	81
5.7 ELISA INDIRETO COM OS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS CARREADOS A BSA	85
6 DISCUSSÃO	99
7 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS	116

1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, denominadas popularmente por aranhas marrons, têm ampla distribuição mundial, com mais de 100 espécies já descritas em vários países da Europa, África, Oceania, Ásia, América do Norte, América Central e, principalmente, da América do Sul (PLATNICK, 2009).

No Brasil, foram imputadas como agentes causadores de acidentes, em especial nas regiões Sul e Sudeste, onde predominam as espécies *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (PAULI *et al.*, 2009). Na última década, estudos motivados pela elevada infestação e pelo crescente número de casos sugerem que a distribuição se tornou heterogênea e disseminada por áreas urbanas (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

O envenenamento em humanos pode ser caracterizado por duas variantes clínicas: o loxoscelismo cutâneo e o loxoscelismo sistêmico. O primeiro caracteriza-se pela formação de lesão dermonecrótica. O segundo, também conhecido como loxoscelismo cutâneo-visceral, apresenta manifestações clínicas que podem evoluir, em algumas situações, para coagulação intravascular disseminada, insuficiência renal aguda e em casos mais raros, exantema generalizado e óbito (FUTRELL, 1992; SWANSON e VETTER, 2006).

O mecanismo de ação do veneno está sob constante investigação. Vários estudos vêm sendo realizados para isolar e caracterizar seus componentes, uma mistura altamente complexa de substâncias biologicamente ativas constituída por numerosas proteínas de ação tóxica ou enzimática de diferentes massas moleculares, sais inorgânicos e pequenos peptídeos (DE CASTRO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005).

Inúmeros protocolos para o tratamento do envenenamento loxoscélico já foram propostos e testados. Sendo a soroterapia o único tratamento específico apontado com maior potencial de neutralização na ação do veneno. A habilidade de anticorpos específicos na neutralização da atividade dermonecrótica dos venenos tem sido discutida e comprovada por vários autores (FURLANETTO, 1961; THEAKSTON *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2008; PAULI *et al.*, 2009).

A avaliação da capacidade de neutralização de antivenenos é um passo necessário e indispensável antes de sua liberação para uso terapêutico. A potência

ou sua capacidade neutralizante é tradicionalmente avaliada por testes de soroneutralização da atividade dermonecrótica utilizando-se coelhos como animais de experimentação (FURLANETTO, 1961; PAULI *et al.*, 2006). Este procedimento é laborioso e caro, além disso, exige a necessidade de sacrificar grande número de animais. Devido ao progresso da legislação que proíbe a produção de dor e sofrimento em animais, este procedimento está se tornando inadmissível em inúmeros países (MEIER & STOCKER, 1989). Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos para a avaliação da potência de antivenenos *in vitro* se apresenta cada vez mais importante e imprescindível.

A titulação de antivenenos (antiescorpiônico e antibotrópico) por ELISA, e a correlação da reatividade dos anticorpos com a capacidade neutralizante dos mesmos tem sido examinada e resultados promissores foram observados (BARBOSA *et al.*, 1995; MARIA *et al.*, 2005). Além disso, foi visto que epitopos peptídicos de algumas toxinas foram capazes de induzir, em camundongos (FELICORI *et al.*, 2006) e coelhos (FELICORI *et al.*, 2009; DIAS-LOPES *et al.*, 2010), anticorpos neutralizantes, sugerindo que a potência neutralizante de antivenenos pode ser inferida a partir da sua reatividade com peptídeos antigênicos definidos a partir da sequência de aminoácidos das principais toxinas presentes nos venenos (ALVARENGA *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de métodos *in vitro* para auxiliar na qualificação dos soros equídeos hiperimunes (soros antiloxoscélicos). Para isso, a técnica de ELISA foi empregada, na qual os soros foram testados frente a diferentes antígenos (desde venenos brutos a peptídeos sintéticos) como também, foi realizado o mapeamento de epitopos pelo método de *Spot*. Neste último, membranas contendo peptídeos que cobrem toda sequência de aminoácidos de toxinas representativas dos venenos de três espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) foram testadas frente aos soros de diferentes potências.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARANHAS

As aranhas são artrópodes octópodes áceros pertencentes à ordem Araneae da classe *Arachnida* com o corpo dividido em cefalotórax e abdômen caracterizados pela existência de um exoesqueleto articulado quitinoso. Diferenciam-se pela presença de um par de artículos (quelíceras), um par de palpos, quatro pares de pernas ligados ao cefalotórax e fiandeiras no abdômen (BARNES *et al.*, 2005).

As aranhas estão presentes em todos os tipos de ecótopos e podem ser encontradas em todos os continentes, exceto na Antártida. Muitas estão adaptadas inclusive ao ambiente antrópico, contribuindo para a biodiversidade global com mais de 40.900 espécies descritas (PLATNICK, 2009). Araneae é apontada como a sétima ordem mais bem sucedida dos invertebrados terrestres. Apesar da imensa diversidade biológica e ecológica das aranhas, poucas espécies estão relacionadas com acidentes envolvendo humanos (VETTER E VISSCHER, 1998).

Sua estratégia trófica, a predação, tem importância direta para o homem, uma vez que as populações de insetos, sua principal presa, são por elas reguladas tanto em seu habitat natural quanto no ambiente antrópico, o que as tornam imprescindíveis no controle de pragas agrícolas e vetores de afecções ao homem. Além de insetos podem alimentar-se de outros artrópodes e pequenos vertebrados (CODDINGTON e LEVI, 1991; FOELIX, 1996).

As aranhas consideradas mais perigosas e de maior importância médica pertencem à subordem Araneomorphae, caracterizadas por apresentar ferrões inoculadores de veneno perpendiculares ao eixo longitudinal do corpo, entre elas, destacam-se aranhas de três gêneros: *Latrodectus* (viúva-negra), *Loxosceles* (aranha marrom ou violino) e *Phoneutria* (armadeira) (ESCOUBAS *et al.*, 2000; APPEL *et al.*, 2005). No Brasil é possível encontrar representantes de todos os gêneros considerados de importância médica (PLATNICK, 2007). Além dos mencionados, a Organização Mundial da Saúde (OMS), também considera o gênero *Atrax* da subordem Mygalomorphae responsável por envenenamentos graves ao homem (WHO, 1981).

2.1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Araneae, subordem Araneomorphae e à família Sicariidae (PLATNICK, 2008). Popularmente conhecidas como aranhas marrons por apresentarem coloração corporal tipicamente marrom (FIGURA 1A), as aranhas deste gênero também são identificadas como aranhas violino devido à forma peculiar da região dorsal do cefalotórax semelhante ao instrumento musical (FIGURA 1B) (FUTREL, 1992).

Uma característica especialmente importante na identificação de aranhas do gênero *Loxosceles* é a presença de seis olhos agrupados em três pares (díades) organizados em semicírculo (“U”) na região anterior do cefalotórax (FIGURA 1B). De regra, as aranhas são pequenas, com tamanho corporal variando de um a dois centímetros com três a quatro centímetros de envergadura (SWANSON e VETTER, 2006).

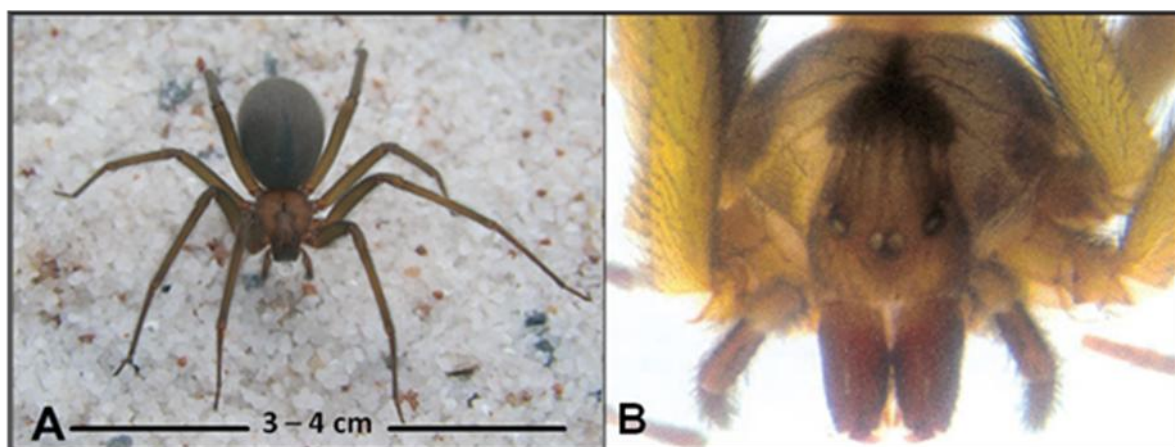


FIGURA 1 – MORFOLOGIA DAS ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*. (A) Aspecto geral de uma aranha do gênero *Loxosceles*. (B) Visão anterior de *Loxosceles* sp. mostrando o padrão de disposição dos seis olhos em três díades e a pigmentação em forma de violino no cefalotórax. Fonte: Adaptado de SILVEIRA, 2009; SWANSON e VETTER, 2006.

Normalmente, as aranhas marrons são lucífugas e sedentárias, possuem hábitos noturnos e comumente são encontradas em habitat natural sob pedras, troncos de árvores, restos vegetais, fendas e cavernas. Por se adaptarem facilmente ao ambiente urbano, podem ser encontradas em regiões peridomiciliares sob telhas, tijolos, madeiras empilhadas e frequentemente achadas em ambientes

intradomiciliares, atrás de quadros, no meio de roupas, livros e de outros objetos, lugares de pouco movimento. Em geral, não são agressivas e os acidentes acontecem quando estas se sentem ameaçadas ou quando são pressionadas acidentalmente contra o corpo humano (LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992; ANDRADE *et al.*, 1999).

Os espécimes apresentam dimorfismo sexual, os machos têm corpo menor e pernas relativamente mais longas do que as fêmeas (FIGURA 2), o último segmento dos pedipalpos dos machos é modificado (aumentados e em forma de maçaneta) para exercerem a função de órgãos copulatórios, já nas fêmeas são curtos e possuem o mesmo formato das pernas (DA SILVA *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2005). Ambos os sexos são peçonhentos, porém as fêmeas produzem uma quantidade superior de veneno com maior concentração protéica. Além disso, acredita-se que em acidentes com humanos o efeito tóxico do veneno das fêmeas seja mais intenso, ainda que a composição dos venenos de ambos os sexos seja considerada semelhante (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999).

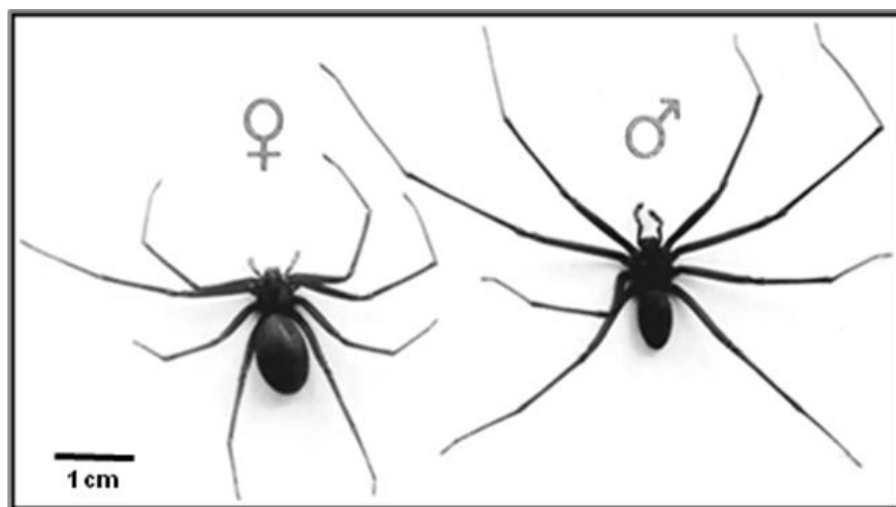


FIGURA 2 – DIMORFISMO SEXUAL DAS ARANHAS. *Loxosceles* sp.
Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2004.

As aranhas do gênero *Loxosceles* são predadoras e alimentam-se de pequenos insetos, ordinariamente preferem presas mortas a caçar presas vivas. Constroem teias irregulares com grande capacidade de retenção e persistência da adesividade por longos períodos. Desse modo, sobrevivem bem a escassez de alimento e água por vários dias ou até meses, se reproduzindo com facilidade

mesmo em ambientes desfavoráveis. Ademais, toleram grandes variações de temperaturas (8 a 43°C) (SAMS *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004).

O gênero *Loxosceles* é cosmopolita e adaptado a distintas condições ambientais das zonas de clima tropical, subtropical e temperado, podendo ser achado em diferentes latitudes do globo terrestre (TAVARES, 2007). Possui mais de 100 espécies já descritas com ampla distribuição geográfica, sendo encontrado na África do Sul, América do Norte e Central, Austrália, algumas partes da Ásia e da Europa (PLATNICK, 2009).

No Brasil, existem atualmente dez espécies descritas: *L. adelaida*, *L. amazonica*, *L. anomala*, *L. gaucho*, *L. hirsuta*, *L. immodesta*, *L. intermedia*, *L. similis*, *L. laeta* e *L. puortoi* (GERTSCH, 1967; ALVARES *et al.*, 2004). Sendo as espécies *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* as responsáveis pela maioria dos acidentes notificados por este gênero no país (FIGURA 3) (HOGAN *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

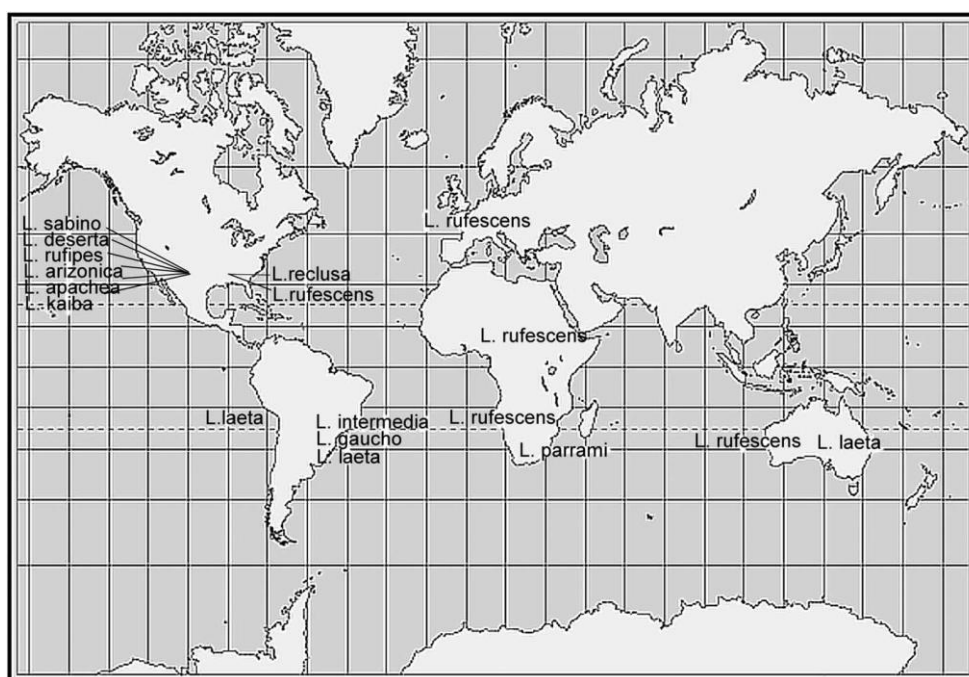


FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* DE IMPORTÂNCIA MÉDICA. Fonte: HOGAN *et al.*, 2004.

Além do desaparecimento de seus predadores naturais (as lagartixas, *Hemidactylus mabouia*), o aumento da sua população também pode ser atribuído ao grande crescimento das cidades, com consequente destruição do seu habitat. Como

resultado desse desequilíbrio ambiental, essas aranhas encontraram no ambiente domiciliar um excelente local para sua sobrevivência e reprodução, favorecendo infestações e o aumento de casos de loxoscelismo, sendo considerado um problema de saúde pública em muitas regiões metropolitanas do mundo (DA SILVA *et al.*, 2004; MARQUES DA SILVA e FISCHER, 2005).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O loxoscelismo foi primeiramente descrito nos Estados Unidos, em 1872 (CAVENESS, 1872), seguido de outros casos identificados em países como Chile, Peru e Argentina. No Brasil, o primeiro caso reportado de acidente necrótico cutâneo causado por veneno de aranha foi em 1891, mas somente em 1954, tais acidentes foram relacionados com aranhas do gênero *Loxosceles* (CARDOSO e DE CILLO, 1990; PAULI *et al.*, 2009).

Atualmente, o estado do Paraná concentra a maior parte dos acidentes loxoscélicos do Brasil (57%) (CHENET *et al.*, 2009) e mantém registros atualizados com aproximadamente 5700 casos notificados anualmente (GRÁFICO 1) (SINAN, 2010), provocados por diferentes espécies como *L. intermedia* (67%), *L. gaucho* (19,5%), *L. laeta* (10,8%) e *L. hirsuta* (2,4%) (MARQUES DA SILVA e FISCHER, 2005). O estado de Santa Catarina participa com o segundo lugar em número de registros (18%), seguido por São Paulo, com 10% do total de acidentes em território nacional (CHENET *et al.*, 2009).

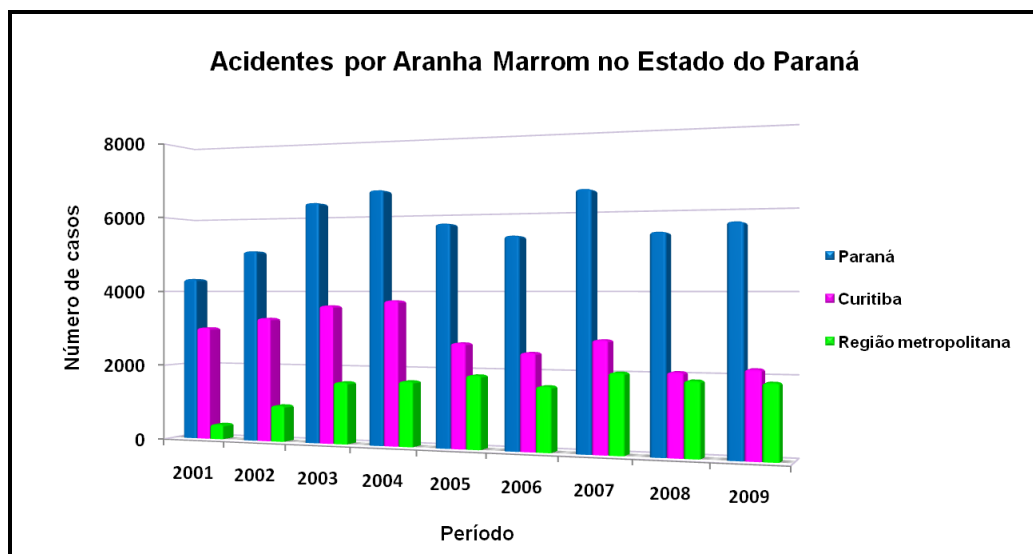


GRÁFICO 1 – NÚMERO DE ACIDENTES POR ARANHA MARROM NO ESTADO DO PARANÁ. Fonte: Secretária Estadual de Saúde Ambiental do Paraná (SESA) / Sistema nacional de notificações de Agravos (SINAN), 2010.

Estudos de mapeamento de acidentes loxoscélicos indicam que a espécie *L. intermedia* está disseminada por toda a área urbana de Curitiba e região metropolitana (FIGURA 4). A distribuição de casos de acidentes é heterogênea, com maior frequência de acidentes longe de áreas verdes (MARQUES DA SILVA e FISCHER, 2005). Em um levantamento das espécies de *Loxosceles* em áreas urbanas e rurais, no estado do Paraná, *L. intermedia* incidiu em mais da metade das residências inspecionadas (FISCHER *et al.*, 2009).

A espécie *L. intermedia* desloca-se com maior frequência e a maiores distâncias da teia que *L. gaucho* ou *L. laeta* durante a noite, além disso, muda com maior frequência o local de construção de sua teia, aumentando as chances de encontros com humanos e, portanto acidentes. A maior incidência de picadas ocorre nos meses de verão, e em pacientes do sexo feminino, sendo os membros superiores e inferiores, os principais locais atingidos (MARQUES DA SILVA, 2002).

Pelo fato de ser uma espécie generalista e errante, *L. intermedia* se adapta facilmente a diferentes ambientes antrópicos, logo, medidas como o manejo de substratos preferenciais, manutenção de espécies predadoras ou competidoras e o monitoramento das populações são essenciais para o controle dessas aranhas (FISCHER e SCHWARTZ, 2010).

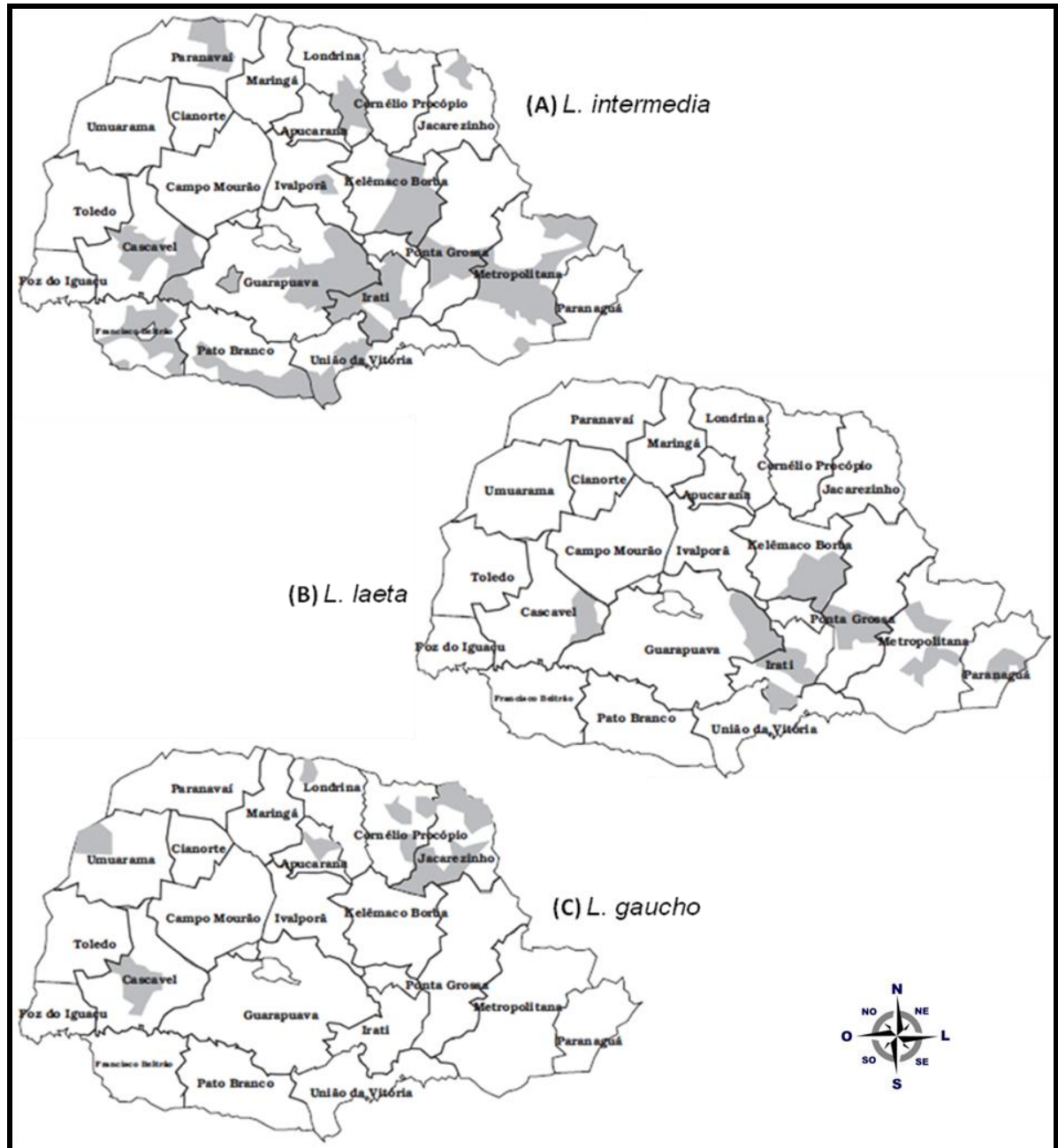


FIGURA 4 – MAPAS DA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Loxosceles* POR MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARANÁ – BR. *Loxosceles intermedia* (Figura 4A), *Loxosceles laeta* (Figura 4B) e *Loxosceles gaucho* (Figura 4C). As divisas correspondem as 22 Regionais de Saúde da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná – SESA. Fonte: Adaptado de MARQUES DA SILVA e FISCHER, 2005.

2.3 LOXOSCELISMO

Loxoscelismo, araquidismo necrótico ou gangrenoso são alguns dos termos utilizados para descrever lesões cutâneas necróticas degenerativas e manifestações clínicas caracterizadas por falha renal e distúrbios hematológicos provocados por acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992).

As manifestações decorrentes do envenenamento em humanos podem apresentar dois quadros clínicos principais: o loxoscelismo cutâneo ou dermonecrótico, forma predominante, observada em 84 a 97% (TAMBOURGI *et al.*, 2010) dos casos descritos e o loxoscelismo sistêmico ou cutâneo-visceral com manifestações mais graves e infrequentes (FUTRELL, 1992; SWANSON e VETTER, 2006).

O loxoscelismo cutâneo caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesão dermonecrótica, de instalação lenta e progressiva, no local da inoculação do veneno (REES *et al.*, 1984). A picada é indolor e a lesão é praticamente imperceptível no momento. Em seguida, pode surgir a dor (2 a 8 horas), provavelmente, devido à isquemia provocada por vasoconstrição (TAMBOURGI *et al.*, 2010), variando de moderada a severa, descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência. Edema, eritema, prurido, náusea, cefaléia, mialgia, mal-estar geral e febre, também podem ser observados (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006).

Biópsias consecutivas do desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo em humanos não foram executadas. Porém, as mudanças histopatológicas informadas incluem espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea. Após algumas horas e ainda dias, é possível observar equimose e isquemia, com formação de placa marmórea (FIGURA 5A), com espalhamento gravitacional, bem característico, além do acúmulo de leucócitos polimorfonucleares e formação de abscesso, evoluindo para úlcera necrótica com formação de uma escara de lenta cicatrização (FIGURA 5B), acarretando sequelas deformantes que, em alguns casos, requerem excisão cirúrgica e enxerto (FUTRELL, 1992; SAMS *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2005; SWANSON e VETTER, 2006; CABRERIZO *et al.*, 2009).

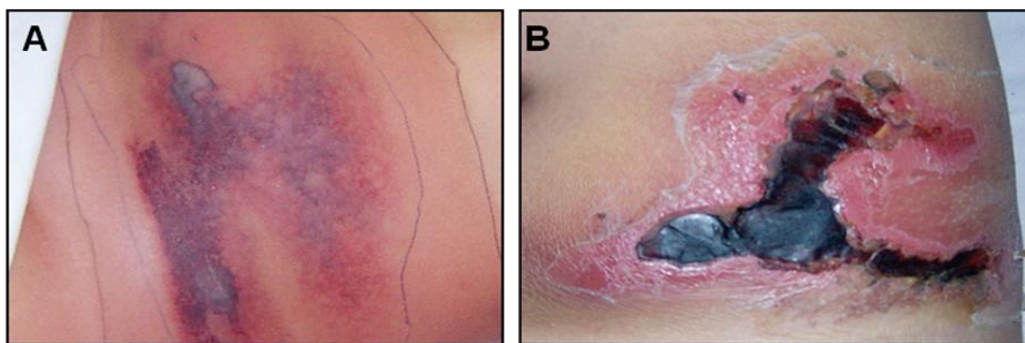


FIGURA 5 - LESÃO CAUSADA PELA PICADA DE ARANHA MARROM (*Loxosceles* sp.). (A) Placa marmórea – eritema e isquemia com áreas de equimose e espalhamento gravitacional observada 36 horas após a picada. (B) Escara necrótica após 8 dias. FONTE: Adaptado de CABRERIZO *et al.*, 2009.

Observado somente nos eventos mais graves, associados ao quadro cutâneo ou não, o loxoscelismo sistêmico ou cutâneo-visceral, ocorre em apenas 3 a 16% dos casos. As primeiras manifestações podem aparecer horas ou dias após o acidente, caracterizadas por distúrbios hematológicos como anemia hemolítica, trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária, icterícia, hematúria, hemoglobinúria, coagulação intravascular disseminada, alterações vasculares nos pulmões e fígado, além de insuficiência renal aguda, principal causa de óbito por loxoscelismo (FUTRELL, 1992; TAMBOURGI *et al.*, 1998; HOGAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004).

Os fatores que contribuem para a evolução das manifestações clínicas não estão completamente esclarecidos. Todavia, acredita-se que o desenvolvimento de um quadro e a gravidade do acidente dependem de alguns fatores relacionados à aranha envolvida, como espécie (TAMBOURGI *et al.*, 1995), sexo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005), estágio de desenvolvimento (ANDRADE *et al.*, 1999) quantidade e concentração de veneno inoculados; bem como as características do indivíduo acidentado, tais como idade, estado nutricional, local da picada, participação de diferentes mediadores endógenos da inflamação, constituição e variações genéticas, além do tempo de início do tratamento adequado (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006; PAULI *et al.*, 2009; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

A identificação da espécie de *Loxosceles* causadora do acidente é um importante fator para determinação da evolução clínica, do prognóstico e para direcionamento do tratamento, uma vez que, o diagnóstico dos acidentes loxoscélicos é fundamentalmente clínico-epidemiológico, baseado em análise

cautelosa da história, sinais e sintomas clínicos apresentados, associados à identificação da aranha, além da possibilidade de contato da pessoa com a mesma em seu meio, levando à exclusão de outras etiologias, como picadas por outros artrópodes, infecções e dermatites (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2009).

2.4 VENENO E MECANISMO DE AÇÃO

Produzido por um par de glândulas situadas no cefalotórax, o veneno de *Loxosceles* sp., de natureza essencialmente protéica, é um líquido cristalino e incolor, composto basicamente por enzimas e moléculas biologicamente ativas de composição e concentração variáveis, sujeito a alguns fatores como espécie, idade e sexo do animal (DE CASTRO *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Durante o acidente loxoscélico, aranhas adultas injetam apenas alguns microlitros de veneno, contendo não mais que 30 µg de proteínas, e apesar de ínfima quantidade, o mesmo é capaz de induzir graves reações locais e sistêmicas (TAMBOURGI *et al.*, 2010), relatadas anteriormente.

Estudos de identificação, caracterização bioquímica e do efeito biológico das toxinas presentes no veneno têm sido intensamente realizados e revelam que além da grande quantidade de proteínas de diferentes pesos moleculares, sais inorgânicos e pequenos peptídeos, a mistura também é constituída por ácidos nucleicos, aminoácidos livres, monoaminas e poliaminas neurotóxicas (ESCOUBAS *et al.*, 2000; DE CASTRO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005).

Várias toxinas com atividade enzimática vêm sendo descritas em venenos de diversas espécies de *Loxosceles*, entre as quais se destacam fosfatase alcalina, 5' ribonucleotídeo fosfohidrolase (FUTRELL, 1992), metaloproteases (FEITOSA *et al.*, 1998), serinoproteases (VEIGA *et al.*, 2000), lipases, hialuronidases e fosfolipases D (FUTRELL, 1992; TAMBOURGI *et al.*, 1998; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; SILVESTRE *et al.*, 2005).

Embora a lesão em humanos, induzida pelo veneno, seja facilmente reproduzida em modelos animais experimentais, os mecanismos celulares e

moleculares que contribuem para o desenvolvimento e estabelecimento do loxoscelismo não foram totalmente definidos (TAMBOURGI *et al.*, 2005).

Acredita-se que o efeito tóxico do veneno se deve à atividade em conjunto dos diferentes constituintes, portanto, um evento sinérgico. A ação direta do veneno sobre os componentes da membrana celular, membrana basal e matriz extracelular, induz lesão dermonecrotica e promove a ativação do sistema complemento e a migração de leucócitos polimorfonucleares (TAMBOURGI *et al.*, 2000; TAMBOURGI *et al.*, 2002).

Os fenômenos de trombocitopenia, coagulação intravascular e o quadro hemorrágico são também fenômenos dependentes de moléculas da matriz extracelular, como a fibronectina plasmática e fibrinogênio, a atividade proteolítica do veneno possivelmente atua sobre esses substratos. O sistema complemento no plasma, igualmente participa nas atividades nocivas do veneno, especialmente nos eritrócitos, causando hemólise (TAMBOURGI *et al.*, 1995; TAMBOURGI *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2005). Todavia, CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011 demonstrou que o veneno de *L. intermedia* foi suficientemente capaz de desencadear hemólise de eritrócitos humanos *in vitro*, independente de complemento.

As células nucleadas e eritrócitos são resistentes a morte mediada por complemento autólogo através de mecanismos conhecidos, como a presença de fatores reguladores das vias alternativa e clássica, presentes na membrana. A remoção, bloqueio, alterações funcionais ou estruturais destes reguladores pode privar as células de seus mecanismos naturais de proteção contra os efeitos da ativação espontânea do complemento. A falha no controle da ativação do sistema complemento induzida pelo veneno de *Loxosceles*, não é devida a remoção ou bloqueio funcional de moléculas regulatórias do sistema do complemento, mas sim a outra modificação que também promove a falha da regulação. A superfície de hemácias humanas abriga resíduos de ácido siálico que estão, principalmente, associados às moléculas de glicoforinas, cuja ação inibitória do sistema do complemento foi reportada (TAMBOURGI *et al.*, 1995).

TAMBOURGI *et al.*, 2000, mostraram que o veneno de *L. intermedia* e suas SMases D purificadas, quando incubados com eritrócitos humanos, tem a capacidade de induzir clivagem das glicoforinas A, B e C da membrana dessas células. No entanto, o uso de quelantes de íons bivalentes, como o EDTA, e do

inibidor de metaloproteases, 1,10-fenantrolina, inibiu a remoção dessas moléculas da superfície dos eritrócitos sugerindo que a clivagem das glicoforinas da membrana dos eritrócitos humanos tratados com os venenos ocorre de forma indireta, pela indução da ativação de metaloproteases endógenas.

Também foram identificadas no veneno de *L. intermedia* metaloproteases de baixa massa molecular, denominadas Loxolisina A (20-28 kDa) e Loxolisina B (32-35 kDa). A atividade dessas metaloproteases está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos decorrentes da atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (Loxolisina A), e gelatinolítica (Loxolisina B), tais como hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos, interferência na adesão plaquetária e também dificuldade na cicatrização das lesões cutâneas (FEITOSA *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2004)

Atividade gelatinolítica presente no veneno de *L. intermedia* também foi identificada por ação de serino-proteases de 85 e 95 kDa. Possivelmente relacionadas com a atividade tóxica do veneno, estas proteases degradam proteínas da matriz extracelular e de membranas basais podendo estar envolvidas também com distúrbios hemorrágicos, agravamento da lesão dermonecrótica e aumento da permeabilidade vascular (Da SILVA *et al.*, 2004).

Consideradas importantes componentes do veneno, responsáveis no estabelecimento dos efeitos locais e sistêmicos, incluindo dermonecrose, hemólise e toxicidade renal, além das reações envolvendo componentes do sistema complemento, as proteínas da família Loxtox ou toxinas dermonecróticas, em especial as enzimas esfingomielinases-D (SMases D), foram reclassificadas como fosfolipases-D (31-35 kDa). O termo foi recentemente substituído com base em análises bioquímicas dos fosfolipídios degradados, a fim de representar uma denominação mais exata e ampla, visto que essas toxinas não convertem somente esfingomielina a colina e ceramida-1-fosfato, mas também hidrolisam glicerofosfolipídios gerando ácido lisofosfatídico (CHAIM *et al.*, 2011; GIUSEPPE *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação das fosfolipases ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que a hidrólise de lipídios, gera mediadores capazes de ativar determinadas vias de sinalização causando alterações fisiopatológicas e efeitos deletérios (KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009).

FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002 clonaram e expressaram, funcionalmente, uma toxina de aproximadamente 32 kDa do veneno de *L. laeta*, que

foi denominada de esfingomielinase-D (SMase I - código PDB: 1xx1). Essa proteína apresenta as atividades tóxicas descritas para o veneno total de *Loxosceles*. Igualmente, KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002 reportaram a clonagem e expressão de uma proteína presente no veneno de *L. intermedia*, nomeada LiD1 (32 kDa, aproximadamente), obtida a partir da glândula de veneno, com atividade biológica e sequência aminoacídica corresponde à família de proteínas com atividade dermonecrótica. A LiD1 foi reconhecida por anticorpos antitoxina dermonecrótica e também foi capaz de induzir proteção contra as toxinas presentes no veneno bruto de *L. intermedia* (ARAÚJO *et al.*, 2003).

A primeira estrutura em cristal de um membro da família das proteínas fosfolipases-D foi descrita por MURAKAMI *et al.*, 2005. Com base na sua estrutura tridimensional determinada, um mecanismo ácido-base catalítico foi proposto, no qual resíduos presentes no sítio ativo da enzima foram identificados e um padrão de conservação de aminoácidos envolvidos na catálise além da coordenação do íon divalente (Mg^{+2}) foram observados.

Recentemente, a análise transcriptômica do veneno de aranha de *L. laeta* gerou 3.008 sequências expressas de uma biblioteca de cDNA, das quais 16,4% das sequências codificantes transcritas pertenciam a toxina reconhecida como SMase-D (fosfolipase-D), 14,5% corresponderam a metaloproteinases, serinoproteinases, hialuronidases, lipases, inibidores de cisteína e peptidases, 33% das moléculas representadas estavam envolvidas na expressão gênica e proteica e 25% das transcrições não apresentavam semelhança significativa para qualquer sequência conhecida (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). Já para *L. intermedia* a análise transcriptômica revelou que 43,4% das transcrições analisadas (1843 sequências expressas) correspondiam a sequências de toxinas, das quais 8,8% pertenciam a fosfolipase-D (GREMSKI *et al.*, 2010). Tais estudos sugerem sobre a riqueza dos componentes presentes nos venenos e, mesmo a fração dermonecrótica sendo a mais importante na indução de anticorpos neutralizantes, é esperada também a produção de anticorpos voltados para outras moléculas do veneno, igualmente imunogênicas, mas não necessariamente tóxicas ao homem. Desse modo, é importante o estudo das propriedades antigênicas e imunogênicas das proteínas dermonecróticas para o melhor entendimento dos mecanismos de neutralização dos antivenenos.

2.5 TRATAMENTOS DO LOXOSCELISMO

A compreensão do mecanismo de ação do veneno *Loxosceles* em reações locais e sistêmicas é essencial para o entendimento do desenvolvimento da patologia, assim como para o emprego de terapias mais eficazes. O desconhecimento da ação sinérgica de todas as toxinas presentes no veneno bruto, somado a dificuldade no diagnóstico específico e rápido do loxoscelismo leva a falta do estabelecimento de uma terapia específica e eficiente. Diferentes intervenções e medicamentos têm sido propostos, tais como: assepsia local, analgésicos, vasodilatadores, anti-histamínicos, antibióticos, corticóides, dapsona, excisão cirúrgica e antivenenos. No entanto, as pesquisas tem sido inconclusivas, com poucas evidências para suportar essa variedade de tratamentos (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006; PAULI *et al.*, 2006).

As ações terapêuticas habitualmente utilizadas em diferentes países são estabelecidas de acordo com a experiência regional e com as características do envenenamento, sendo as mais empregadas os corticóides, os antibióticos profiláticos, a dapsona e, a soroterapia, considerada como sendo o único tratamento específico (PAULI *et al.*, 2006).

Corticóides são utilizados no tratamento do loxoscelismo como moduladores da resposta inflamatória (PAULI *et al.*, 2009). Esses compostos são administrados em casos graves, especialmente em crianças, acreditando prevenir a hemólise e a falência renal, quando aplicados logo nas primeiras horas do envenenamento. No entanto, foi constatado que seu uso não inativa o veneno ou inibe os seus efeitos primários, não prevenindo assim, o aparecimento da necrose (GOMEZ *et al.*, 1999; HOGAN *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006).

O uso de antibióticos na terapêutica do envenenamento é comum. Tal tratamento é empregado na tentativa de prevenir infecções secundárias no local da picada (HOGAN *et al.*, 2004). PAIXÃO-CAVALCANTI *et al.*, 2007, descrevem a possibilidade do uso de tetraciclina tópica no tratamento e neutralização da lesão dermonecrotica, já que este antibiótico age como quelante de metais divalentes, inibindo a ação de metaloproteinases endógenas, cuja expressão seria estimulada pela ação do veneno. O aumento de metalonoproteinases no local da lesão tem um significado terapêutico potencial, dado o desenvolvimento e a disponibilidade de

medicamentos inibidores. Assim sendo, o uso de tetraciclina no tratamento do loxoscelismo cutâneo é promissor, pois além de reduzir a formação de dermonecrosis, tem ação antimicrobiana de amplo espectro, prevenindo a infecção da ferida (TAMBOURGI *et al.*, 2010).

A maioria das terapias empregadas almejam reduzir a infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), marca do loxoscelismo cutâneo. Contudo, tratamentos com o objetivo de reduzir a infiltração provocam sérios efeitos colaterais agravando ainda mais o quadro clínico do acidentado (DA SILVA *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

A dapsona é um medicamento usado no tratamento da lepra e nos últimos anos tem sido recomendada para os casos de envenenamentos por *Loxosceles* (DA SILVA *et al.*, 2004). Seu efeito se dá pela inibição da migração e infiltração de neutrófilos no foco inflamatório da lesão, retardando assim a injúria tecidual mediada pela ação dessas células (HOGAN *et al.*, 2004). Todavia, o uso da dapsona não é indicado em casos de loxoscelismo sistêmico e alguns autores questionam sua eficiência, devido à falta de estudos mais aprofundados sobre sua ação após muitas horas do acidente (FUTRELL, 1992; HOGAN *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2006). Além disso, o uso deste medicamento pode provocar efeitos adversos significativos, incluindo icterícia, hepatite, leucopenia, metemoglobinemia e, raramente, neuropatia periférica. (HOGAN *et al.*, 2004).

A considerável morbidade dos acidentes loxoscélicos levou ao desenvolvimento e uso de terapia específica com antivenenos. Sendo a soroterapia o tratamento mais indicado para os casos de envenenamento por *Loxosceles*, proposto para a neutralização das toxinas circulantes dos venenos, por moléculas heterólogas e específicas, presentes nos antivenenos. Acredita-se que essa terapia reduza os riscos de desenvolvimento do quadro sistêmico. Utilizada com maior frequência no Brasil, houve a necessidade do desenvolvimento de diretrizes para seu uso, sendo indicada apenas a pacientes com lesões cutâneas graves ou manifestações sistêmicas (HOGAN *et al.*, 2004).

2.6 PRODUÇÃO DE ANTIVENENOS

Um dos principais intentos no estudo de toxinas é a busca de uma terapia adequada para envenenamentos causados por animais peçonhentos. Atualmente, a soroterapia é considerada a terapêutica mais eficiente para reverter os efeitos tóxicos causados, sendo o único tratamento específico apontado com maior potencial de neutralização na ação dos venenos loxoscélicos (PAULI *et al.*, 2009).

A técnica aplicada para a produção de soros consiste na utilização de animais de grande porte. Equídeos, os mais empregados, são imunizados com venenos de uma ou mais espécies de animais peçonhentos de importância médica. Após uma série de ciclos de imunização esses animais são sangrados e os soros obtidos contendo anticorpos com capacidade neutralizante para as toxinas, classificados como mono ou poliespecíficos, também nomeados como mono ou polivalentes, desta forma referidos quando produzidos apenas contra um veneno ou uma combinação deles, respectivamente (THEAKSTON *et al.*, 2003).

Desenvolvido por VELLARD em 1954, o soro antiloxoscélico, passou a ser produzido no Brasil a partir da década de 1960 (FURLANETTO, 1961) e, atualmente, são disponibilizados pelo Ministério da Saúde dois antivenenos poliespecíficos: o soro antiaracnídico e o soro antiloxoscélico. O soro antiaracnídico (SAAR), do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, é produzido a partir de venenos das aranhas *Loxosceles gaucho* e *Phoneutria nigriventer* e dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*. Apesar de tetravalente, contém na mistura de imunização apenas veneno de uma espécie de *Loxosceles*. O soro antiloxoscélico (SALOX), por sua vez, é um soro poliespecífico (trivalente) produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI), Brasil, que contém anticorpos contra os venenos das três espécies de aranhas *Loxosceles* mais importantes do ponto de vista médico no país: *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. (HOGAN *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2009).

Uma medida importante e indispensável no desenvolvimento de antivenenos são os ensaios pré-clínicos realizados *in vivo* e *in vitro*, antes de sua liberação para uso terapêutico, com a finalidade de avaliar o potencial de neutralização do antiveneno contra uma gama de efeitos nocivos do veneno. Em 1979, uma reunião de coordenação da OMS sobre venenos e antivenenos foi realizada para examinar os trabalhos mundiais em andamento sobre o desenvolvimento e padronização de

métodos para avaliação da atividade biológica de venenos clinicamente importantes e a capacidade de neutralização de seus antivenenos. Concluiu-se que os métodos para a medição da atividade necrosante devem ser padronizados, de modo que os efeitos dos soros sobre essa atividade possam ser avaliados por diferentes laboratórios aplicando métodos idênticos (THEAKSTON & REID, 1983).

Reconhecido pela produção do primeiro soro antiloxoscélico em escala e padronização adequada à distribuição para fins terapêuticos, FURLANETTO (1961) estabeleceu a metodologia, ainda hoje utilizada para a titulação deste soro, com base na unidade antinecrosante (UA), que corresponde à menor quantidade de soro antiloxoscélico, que inoculado por via intravenosa, é capaz de neutralizar totalmente o efeito de uma dose mínima necrosante (DMN) de veneno. Neste estudo, foi demonstrado que o coelho é o modelo animal que melhor reproduz os sinais do envenenamento cutâneo em humanos por aranhas *Loxosceles*. Desde então, a potência ou a capacidade neutralizante dos antivenenos loxoscélicos passou a ser tradicionalmente avaliada por testes de soroneutralização da atividade dermonecrótica empregando-se coelhos como animais de experimentação (FURLANETTO, 1961; PAULI *et al.*, 2006).

O teste de potência *in vivo* é um processo extremamente laborioso, oneroso, demorado e de difícil reprodução devido à variação biológica das respostas fisiológicas individuais dos coelhos, além disso, o procedimento molesta e sacrifica um grande número de animais. Este método por razões éticas, científicas, econômicas e legislativas tem se tornado inconveniente e intolerável em inúmeros países e o desenvolvimento de métodos alternativos para a avaliação da capacidade neutralizante dos antivenenos *in vitro* é cada vez mais importante e indispensável (MEIER & STOCKER, 1989). Vários grupos de pesquisadores têm estudado e desenvolvido técnicas, tentando correlacioná-las com o teste de soroneutralização e, possivelmente, sua substituição promovendo e estimulando a redução de experimentos animais (THEAKSTON *et al.*, 2003; MARIA *et al.*, 2005). Diante disso, seria de grande utilidade contar com um método *in vitro* que determinasse a potência de antivenenos de modo confiável, sensível, pouco oneroso e de fácil realização.

Historicamente, THEAKSTON *et al.*, 1977 foram os primeiros pesquisadores a descreverem o uso da técnica imunoenzimática de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para a detecção de veneno de serpentes e de anticorpos

antivenenos, usando IgG fracionada na fase fixa em placa de microtitulação. Nas últimas décadas, diversos métodos de ELISA têm sido propostos e a técnica continuamente aprimorada.

BARBOSA *et al.*, 1995, consideram que o uso do teste de ELISA para determinar a potência de soros antiofídicos, produzidos em equinos, se mostram mais vantajosos em relação ao custo e reprodutibilidade quando comparado aos testes *in vivo*. Além disso, com a utilização de técnicas de ELISA indireto obtiveram alta correlação com soroneutralização para antivenenos crotálicos. Do mesmo modo, MARIA *et al.*, 1998, utilizando fração tóxica do veneno de *Bothrops jararaca*, como antígeno, determinaram eficientemente a potência neutralizante dos antivenenos botrópicos, indicando seu uso na triagem e avaliação de soros de equinos hiperimunizados na produção dos soros antibotrópicos.

Entretanto, apesar da demanda de antivenenos loxoscélicos no Brasil e no mundo, até o momento, não existe citação de trabalhos que correlacione resultados de testes *in vitro* com seu potencial neutralizante.

Sabe-se que capacidade neutralizante dos soros antiloxoscélicos equinos está ligada a presença de anticorpos específicos produzidos contra os diversos componentes tóxicos contidos nos venenos (PAULI *et al.*, 2009), especialmente contra as proteínas fosfolipases-D de 32-35 kDa que são os componentes imunogênicos e os maiores responsáveis pela dermonecrose (BARBARO *et al.*, 1996; TAMBOURGI *et al.*, 2004).

A identificação de epitopos imunogênicos das proteínas dermonecróticas pode fornecer dados importantes sobre os aspectos funcionais e estruturais dessas moléculas. Além disso, o reconhecimento destas regiões parece estar associado com a hipótese de que a potência neutralizante de antivenenos pode ser inferida a partir de sua reatividade com peptídeos antigênicos definidos a partir da sequência primária de aminoácidos de proteínas presentes nos venenos (MARIA *et al.*, 2005; FELICORI *et al.*, 2009; DIAS-LOPES *et al.*, 2010; ALVARENGA *et al.*, 2010), sugerindo a utilização de proteínas dermonecróticas purificadas ou até mesmo apenas as regiões imunodominantes dessas moléculas em testes *in vitro* na qualificação de antivenenos.

Diferentes metodologias foram e vem sendo empregadas para a identificação de epitopos nas proteínas, dentre elas: a técnica de *Phage Display*, o método de *Spot*, além dos estudos de cristalografia de raios-X e métodos de

predição computacional. Para realizar os ensaios de mapeamento dos epitopos de proteínas dermonécroticas das principais espécies de *Loxosceles* de importância médica no Brasil, neste estudo foi utilizado o método de *Spot*. A técnica baseia-se na verificação da reatividade de anticorpos mono ou policlonais frente a peptídeos, que cobrem toda sequência de aminoácidos de uma proteína, sintetizados sobre uma membrana de celulose. Essa técnica permite que um grande número de peptídeos possam ser sintetizados (síntese paralela) e testados simultaneamente para identificar e caracterizar os sítios de ligação de interesse (FRANK, 1992).

Nesse sentido, o presente trabalho explora a possibilidade do mapeamento e estudo de epitopos de toxinas dermonecroticas frente a soros antiloxoscélicos de diferentes potencias, a fim de propor a utilização de epitopos sintéticos em imunoensaios, que possam correlacionar reatividade com potencia neutralizante.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

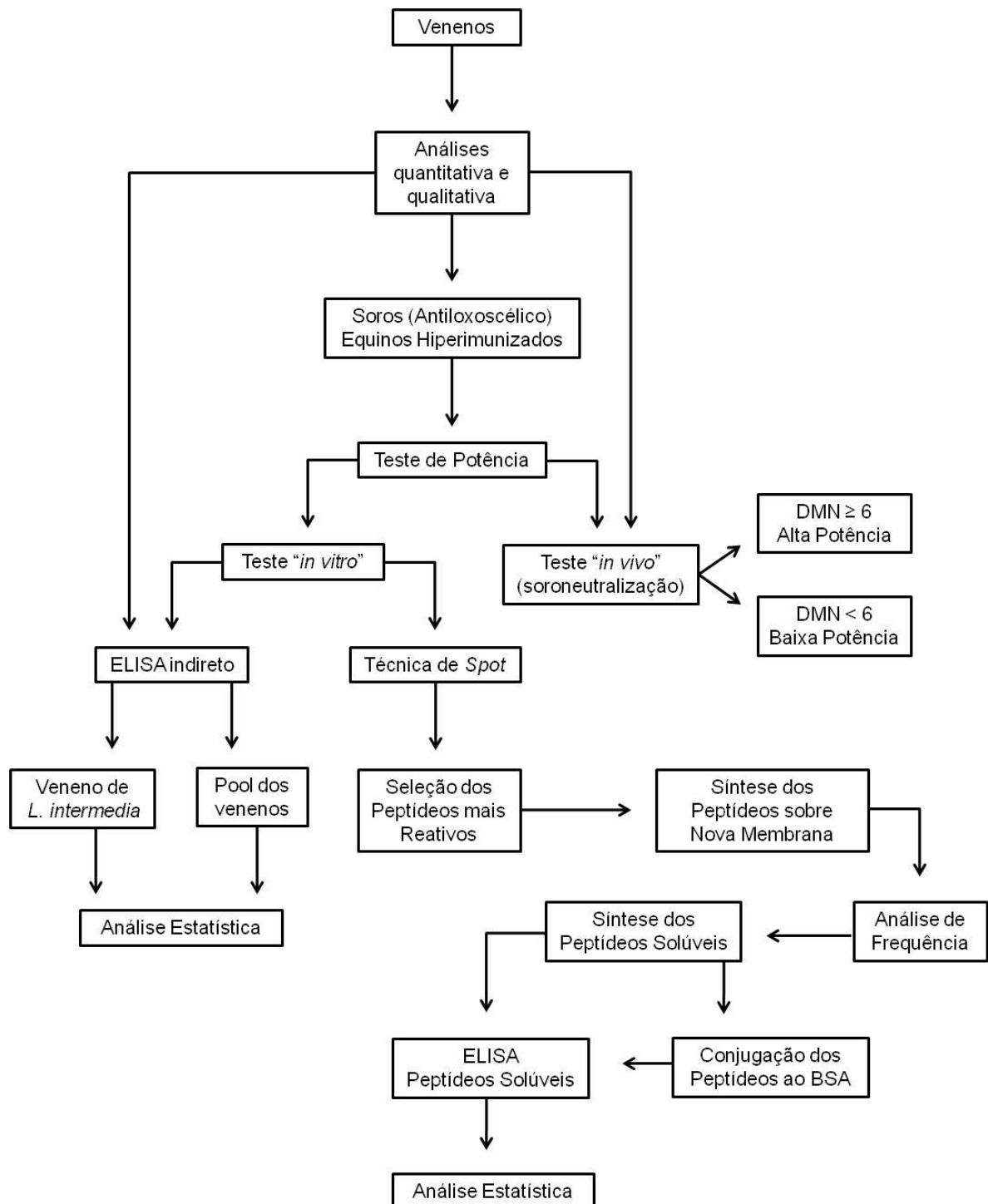
Desenvolver um teste *in vitro* capaz de correlacionar o potencial neutralizante dos soros antiloxoscélicos com o título de anticorpos contra epitopos sintéticos.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar os soros quanto ao título de anticorpos por teste de ELISA indireto, utilizando venenos de espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) de maior importância médica no Brasil;
2. Identificar epitopos de Fosfolipases-D pelo método de *SPOT* empregando os soros de diferentes potencias previamente caracterizados por testes de soroneutralização *in vivo*;
3. Analisar as propriedades físico-químicas dos epitopos identificados;
4. Padronizar o método de ELISA, com peptídeos solúveis imobilizados na placa;
5. Analisar estatisticamente os resultados e comparar com os dados *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Com a intenção de promover o melhor entendimento da sequência experimental empregada para alcançar os objetivos propostos, o fluxograma apresentado abaixo resume as diferentes etapas realizadas neste estudo.



4.1 VENENOS

Obtenção e armazenamento: Os venenos dos lotes SVLI 73/09 (*L. laeta*), SVLg 74/09 (*L. gaucha*) e SVLi 75/09 (*L. intermedia*), provenientes de aranhas do gênero *Loxosceles*, capturadas em Curitiba e região metropolitana e identificadas taxonomicamente foram fornecidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI (Paraná, PR, Brasil). Obtidos por estimulação elétrica (15 volts) aplicada ao cefalotórax de espécimes adultos, os venenos foram agrupados de forma independente, dessecados a vácuo, filtrados, dosados, aliquotados e conservados a – 20°C. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de LOWRY *et al.*, 1951, e a concentração ajustada para 1 mg/mL, com solução salina estéril. Os venenos de outros artrópodes como os da abelha *Apis mellifera* e do escorpião *Tityus serrulatus* foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Carlos Chávez Olórtegui da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Determinação da dose mínima necrosante (DMN): Conforme recomendado por THEAKSTON *et al.*, 2003 foi padronizada a quantidade de veneno a ser inoculada nos testes *in vivo* pela atividade biológica estabelecida como dose mínima necrosante (DMN), visto que venenos com o mesmo conteúdo proteico apresentam toxicidades totalmente diferentes. A DMN foi realizada pela metodologia proposta por FURLANETTO (1961), sendo 1 DMN a quantidade mínima de veneno injetado intradermicamente capaz de provocar na face interna da orelha do coelho uma área necrótica de 1 cm de diâmetro em até 72 horas. O valor obtido serviu para padronizar a quantidade de veneno a ser utilizada na avaliação da potência dos soros *in vivo* também realizada no CPPI.

Análise qualitativa dos venenos por eletroforese: Amostras foram submetidas à eletroforese vertical de poliacrilamida (12,5%) em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE), segundo método descrito por LAEMMLI (1970). As alíquotas foram diluídas em tampão de amostra (Tris HCl 0,5 M, SDS 10%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,1%, pH 6,8) e a separação eletroforética realizada com tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,2 M e SDS 0,5%, pH 8,3), sob uma corrente de 150 V. Após a migração, as bandas foram visualizadas pela impregnação com prata. Para isso, o gel foi lavado com água destilada, e fixado com metanol (50%) por 20 minutos, depois foi lavado por mais 10 minutos com água destilada. Em seguida, foi adicionado glutaraldeído (25%) por 30 minutos, e lavado com água destilada. Para

corar as proteínas, uma solução de nitrato de prata (1%) foi preparada, adicionando-se 53% de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,36% e 3,5% de hidróxido de amônio. O gel foi corado por 20 minutos ao abrigo da luz e lavado com água destilada. Para revelação das bandas impregnadas, o gel foi incubado com uma solução de ácido acético (0,25%) e formaldeído (0,1%). A fim de parar a reação, o gel foi transferido para uma solução *stop* contendo ácido acético (1%) por 20 minutos.

4.2 ANTIVENENOS

As nove amostras de soros antiloxoscélicos usadas nesse estudo foram fornecidas pelo CPPI. Elas foram obtidas a partir de plasma hiperimune de equídeos, imunizados com uma mistura de venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Também no CPPI, foram feitos os ensaios para a qualificação dos soros *in vivo* utilizando coelhos.

Resumidamente, após a coleta dos soros pré imunes, cada cavalo recebeu uma injeção subcutânea inicial de 5 mg de veneno (1,67 mg de cada espécie/dose) solúvel em adjuvante de Freund completo (AFC). Após 30 dias duas injeções adicionais com intervalos de 15 dias em adjuvante de Freund incompleto (AFI) e seis doses posteriores (intervalos de 7 dias) em Hidróxido de Alumínio ($Al(OH)_3$) foram administradas (TABELA 1).

TABELA 1 - PLANO DE IMUNIZAÇÃO DE BASE PARA EQUINOS NO CPPI

Ordem da dose	Tempo de imunização (dia)	Dose do veneno (mg)	Adjuvante (5mL)	Volume final injetado (mL)	Via de inoculação
1 ^a	1°	5	AFC	10	Subcutânea
2 ^a	30°	5	AFI	10	Subcutânea
3 ^a	45°	5	AFI	10	Subcutânea
4 ^a	60°	5	$Al(OH)_3$	10	Subcutânea
5 ^a	67°	5	$Al(OH)_3$	10	Subcutânea
6 ^a	74°	5	$Al(OH)_3$	10	Subcutânea
7 ^a	81°	5	$Al(OH)_3$	10	Subcutânea
8 ^a	88°	5	$Al(OH)_3$	10	Subcutânea
9 ^a	95°	5	$Al(OH)_3$	10	Subcutânea
	102°		Sangria de prova (Teste de potência)		
	109°		1° Sangria de produção		
	111°		2° Sangria de Produção		
	113°		3° Sangria de Produção		

Após 60 dias os animais iniciaram um novo ciclo de imunização com administração de 3 doses (5 mg de veneno/dose) com intervalos de 15 e 7 dias (TABELA 2). Todos os animais foram submetidos no mínimo a dois ciclos de reimunização. Todas as doses de venenos e adjuvantes aplicadas foram diluídas em salina fisiológica estéril perfazendo um volume de 10 mL. Os cavalos foram sangrados uma semana após a última injeção. Cerca de 50 mL de sangue foi coletado e submetido à hemossedimentação a 37°C por 1 hora e o sobrenadante centrifugado. A fração (soro antiloxoscélico) obtida foi armazenada a – 20°C e posteriormente usada nos devidos ensaios.

TABELA 2 - PLANO DE REIMUNIZAÇÃO PARA EQUINOS NO CPPI

Ordem da dose	Tempo de imunização (dia)	Dose do veneno (mg)	Adjuvante (5mL)	Volume final injetado (mL)	Via de inoculação
1ª	1º	5	AFI	10	Subcutânea
2ª	15º	5	AL(OH) ₃	10	Subcutânea
3ª	21º	5	AL(OH) ₃	10	Subcutânea
	28º		Sangria de prova (Teste de potência)		
	35º		1º Sangria de produção		
	37º		2º Sangria de Produção		
	39º		3º Sangria de Produção		

Os anticorpos monoclonais produzidos contra os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (mAb 12) foram produzidos e caracterizados, como descrito por ALVARENGA *et al.*, 2003. Para a purificação do mAb 12 uma coluna de cromatografia de afinidade contendo Proteína G - *Sepharose*® (SIGMA) foi utilizada de acordo com o protocolo do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech – 1993).

A Proteína G - *Sepharose* (1 mL) foi colocada em uma coluna de fluxo por gravidade e submetida a lavagem com PBS (Tampão fosfato salino 0,5 M, pH 7,4). Após lavagem, 50 mL de sobrenadante celular foi adicionado e incubado por 16 horas à 4 °C, sob leve agitação. Após incubação, o sobrenadante foi retirado e a coluna lavada com PBS para remoção de substâncias inespecíficas. Os anticorpos adsorvidos a coluna foram eluídos utilizando-se um tampão de eluição (glicina - HCl 0,2 M, pH 2,8). O eluato foi neutralizado com tampão de neutralização (Tris/HCl 1 M, pH 8,5) e posteriormente, dialisado contra PBS (0,5 M, pH 7,4). Após a diálise, a dosagem protéica da solução contendo os anticorpos foi realizada diretamente a 280 nm. A solução foi estocada a - 20 °C para posteriores ensaios.

4.3 TESTE DE POTÊNCIA “*in vivo*”

A capacidade neutralizante dos soros antiloxoscélicos foi avaliada segundo a metodologia proposta por FURLANETTO (1961), e realizada no CPPI. Para este teste, apenas o veneno de *L. intermedia* (1 DMN) foi inoculado (via intradérmica) na face interna da orelha do coelho (3 animais/diluição de soro testada), concomitantemente à injeção endovenosa (veia marginal da orelha oposta) de 1 mL de soro diluído (1:8 e/ou 1:6) em solução salina. Inicialmente, o soro foi aplicado na diluição 1:8 e os animais observados por 72 horas quanto ao aparecimento de necrose. Durante este período de observação a ocorrência de vestígios de necrose na pele dos animais indicou que o soro equino nesta diluição não foi eficiente para neutralizar a ação do veneno e, então a diluição 1:6 foi aplicada. Sendo considerados de baixa potência somente os soros que não foram capazes de neutralizar 6 DMN do veneno (TABELA 3). Para avaliar as 10 amostras de soros pelo método *in vivo* foram utilizados 48 coelhos, raça Nova Zelândia, proveniente de criadouro qualificado com controle sanitário e zootécnico.

TABELA 3 - RELAÇÃO DOS SOROS FORNECIDOS PELO CPPI USADOS NOS EXPERIMENTOS

Soros #	Identificação dos cavalos no CPPI	Sangria de prova (dia/mês/ano)	DMN	Potência “ <i>in vivo</i> ” *
1	Italiana	-	Pré imune	-
2	0	16 / 07 / 2007	< 6	Baixa
3	11	04 / 12 / 2006	< 6	Baixa
4	362	25 / 04 / 2006	< 6	Baixa
5	15	23 / 06 / 2008	≥ 6	Alta
6	21	23 / 06 / 2008	≥ 6	Alta
7	38	23 / 06 / 2008	≥ 6	Alta
8	39	23 / 06 / 2008	≥ 6	Alta
9	407	23 / 06 / 2008	≥ 6	Alta
10	445	23 / 06 / 2008	≥ 6	Alta

NOTA: # Soros antiloxoscélicos obtidos a partir de plasmas hiperimunes de equídeos, imunizados com uma mistura dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. *Potência considerada após os testes de soroneutralização *in vivo* realizados pelo setor de controle de qualidade do CPPI.

4.4 ELISA INDIRETO COM VENENOS

Todos os soros foram avaliados quanto ao título de anticorpos por teste de ELISA indireto frente aos venenos de *Loxosceles* e a proteína dermonecrótica recombinante LiD1 (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002) do veneno de *L. intermedia*, gentilmente cedida pela Professora Dr^a. Liza Figueiredo Felicori Vilela da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Placas de microtitulação com 96 poços (Falcon - Becton Dickinson) foram sensibilizadas com 2,5 µg/mL de antígenos (ou com o *pool* dos três venenos, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, ou com veneno de *L. intermedia*, ou com proteína recombinante LiD1 somente) diluídos em tampão bicarbonato de sódio (0,05 M) pH 9,6 e incubadas 16 h a 4°C. Depois de lavadas com solução de lavagem (salina Tween-20 0,05%), bloqueadas com tampão de bloqueio (caseína 2% diluída em PBS) por 1 hora a 37°C, as placas foram incubadas com os soros diluídos (1:625 - 1:80000) em tampão de incubação (caseína 0,25% e Tween-20 0,05% em PBS) nas mesmas condições. O conjugado anti IgG cavalo peroxidase (Sigma, diluído 1:30000 em tampão de incubação) foi adicionado e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, o substrato (tampão citrato pH 5,0, peróxido de hidrogênio e cromógeno ortofenilenodiamina – OPD) foi adicionado. A reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ (5%) e os títulos dos anticorpos determinados em função da intensidade da coloração, cuja absorbância foi lida em comprimento de onda de 490 nm por um leitor de ELISA Bio Rad 550. Todas as medições foram feitas em duplicata e os resultados expressos como a média de três ensaios.

4.5 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS DE CELULOSE

A sequência primária dos aminoácidos das proteínas dermonecróticas, uma do veneno de *L. intermedia*, outra veneno de *L. laeta* e outra de *L. gaucho* (TABELA 4), foram utilizadas para preparação da membrana. Duzentos e setenta e oito pentadecapeptídeos lineares (sobrepostos por doze resíduos e mais três resíduos inéditos) que abrangem as sequências das proteínas das diferentes espécies foram sintetizados sobre uma membrana de celulose pelo método de *Spot synthesis* (FRANK, 1992) (FIGURA 6).

TABELA 4 - SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS USADAS NO MAPEAMENTO DOS EPITOPOS CONTÍNUOS.

Espécie / Proteína / Referência / Nº. Localizador	Sequência primária de aminoácidos das toxinas dermonecróticas
<i>L. intermedia</i> / LiD 1 / KALAPOTHAKIS <i>et al.</i> , 2002 / Nº. 33348850	A G N R R P I W I M G H M V N A I G Q I D E F V N L G A N S I E T D V S F D D N A N P E Y T Y H G I P S D S G R N S K K Y E N F N D F L K G L R S A T T P G N S K Y Q E K L V L V V F D L K T G S L Y D N Q A N D A G K K L A K N L L Q H Y W N N G N N G G R A Y I V L S I P D L N H Y P L I K G F K D Q L T K D G H P E L M D K V G H D F S G N D D I G D V G K A Y K K A G I T G H I W Q S D G I T N S L P R G L S R V N A A V A N R D S A N G F I N K V Y Y W T V D K R S T T R D A L D A G V D G I M T N Y P D V I T D V L N E A A Y K K K F R V A T Y D D N P W V T F K K
<i>L. laeta</i> / SMase I - código PDB:1xx1 / FERNANDES-PEDROSA <i>et al.</i> , 2002 / Nº. 60594087	A D N R R P I W N L A H M V N A V A Q I P D F L D L G A N A L E A D V T F K G S V P T Y T Y H G T P S D F G R D S I R W E Y F N V F L K T L R E Y T T P G N A K Y R D G F I L F V L D L K T G S L S N D Q V R P A G E N V A K E L L Q N Y W N N G N N G G R A Y V V L S L P D I G H Y E F V R G F K E V L K K E G H E D L L E K V G Y D F S G P Y L P S L P T L D A T H E A Y K K A G V D G H I W L S D G L T N F S P L G D M A R L K E A I K S R D S A N G F I N K I Y Y W S V D K V S T T K A A L D V G V D G I M T N Y P N V L I G V L K E S G Y N D K Y R L A T Y D D N P W E T F K N
<i>L. gaucho</i> / A1H – LoxGa / SILVESTRE <i>et al.</i> , 2005 / Nº. 74954961	A G N R R P I W I M G H M V N A I G Q I D E F V N L G A N S I E T D V S F D D N A N P E Y T Y H G I P S D S G R N S K K Y E N F N D F L K G L R S A T T P G N S K Y Q E K L V L V V F D L K T G S L Y D N Q A N D A G K K W A K N L L Q H Y W N N G N N G G R A Y I V L S I P D L N H Y P L I K G F K D Q L T K D G H P E L M D K V G H D F S G N D D I S D V G K A Y K K A G I T G H I W Q S D G I T N S L P R G L S R V N A A V A N R D S A N G F I N K V Y Y W T V D K R S T T R D A L D A G V D G I M T N Y P D V I T D V L N E A A Y K K K F R V A T Y D D N P W V T F N K

Resumidamente, os aminoácidos diluídos em DMF (N,N-dimetilformamida) foram depositados em volume mínimo (0,2 - 0,5 µL) sobre a membrana por um micropipetador automático, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto. Os aminoácidos foram fixados pela porção C-terminal e a cadeia peptídica alongada (acoplamentos) em ciclos repetitivos por adições consecutivas de resíduos C-terminal ao N-terminal do aminoácido anterior. A síntese inicia-se pelo C-terminal do último aminoácido da sequência determinada. Os aminoácidos obtidos

comercialmente protegidos pelo grupo Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonil) foram ativados com DIC (diisopropilcarbodiimida) em presença de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e imediatamente aplicados sobre a membrana para acoplamento ao resíduo anterior da sequência aminoacídica já desprotegidos pela adição de piperidina (20% em DMF). As funções NH₂ livres, ou que não reagiram, foram acetiladas com adição de anidrido acético (10% em DMF) para evitar a formação de ligações indesejáveis. O grupo protetor Fmoc do aminoácido recém adicionado foi clivado, em meio básico pela piperidina, dando início novamente ao ciclo de desproteção e acoplamento da síntese peptídica, repetidos alternadamente, até que os peptídeos fossem obtidos, obedecendo às sequências desejadas.

	1	51	280
A1H-LoxGa	-	AGNRRPIWIMGHMVNAIGQIDFVNLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP...	RVATYDDNPWVTENK
189-	AGNRRPIWIMGHMVN		
190-	RRPIWIMGHMVNAIG		
191-	IWIMGHMVNAIGQID		
192-	MGHVMVNAIGQIDFV		
193-	MVNAIGQIDFVNLG		
194-	AIGQIDFVNLGANS		
195-	QIDFVNLGANSIET		
196-	EFVNLGANSIETDVS		
197-	NLGANSIETDVSFDD		
198-	ANSIETDVSFDDNAN		
199-	IETDVSFDDNANPEY		
200-	DVSFDDNANPEYTYH		
201-	FDDNANPEYTYHGIP...		
:	:	:	:
:	:	:	:
278-			RVATYDDNPWVTENK

FIGURA 6 - SEQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS DE 15 AMINOÁCIDOS SINTETIZADOS PELO MÉTODO SPOT SÍNTESE. Figura esquemática da composição em aminoácidos dos peptídeos da proteína A1H - LoxGa do veneno da aranha *L. gaucho*. Os números 189, 190, 191... 278 representam cada spot. Os pentadecapeptídeos são sobrepostos por doze resíduos e mais três inéditos que abrangem as sequências aminoacídicas das proteínas das diferentes espécies de *Loxosceles*. O mesmo procedimento foi feito para as demais proteínas.

As cadeias laterais dos aminoácidos, quando reativas, também são protegidas por grupos estáveis (*t*-butila e tritila) em condições básicas, garantindo sua integridade durante a síntese. Ao final da síntese, os grupos foram desprotegidos pela adição de ácido trifluoroacético (TFA), e assim os peptídeos permaneceram fixados de maneira covalente sobre a membrana. A membrana construída contendo os diversos peptídeos foi analisada por imunensaio.

A síntese múltipla foi realizada pelo sintetizador automático ResPep SL (INTAVIS AG - *Bioanalytical Instruments*) (FIGURA 7).

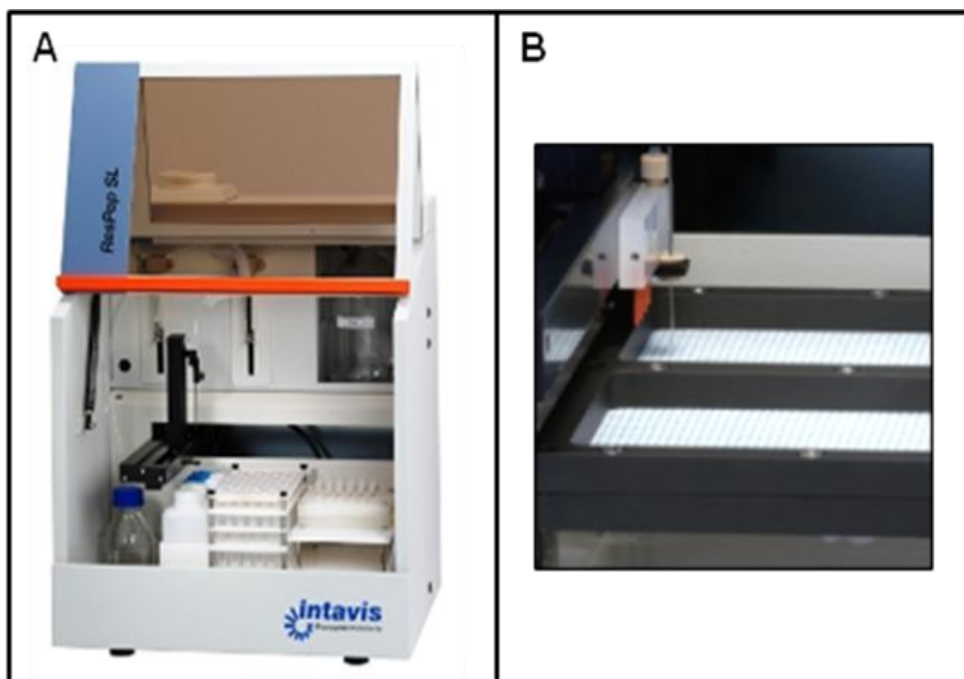


FIGURA 7 - INSTRUMENTO BIOANALÍTICO INTAVIS AG. (A) ResPep SL - Sintetizador automático. (B) ResPep SL em funcionamento - Aplicação automatizada de aminoácidos sobre membrana de celulose. FONTE: http://www.intavis.com/en/Automated_Peptide_Synthesis/ResPep_SL/index.php.

4.6 IMUNOENSAIOS COM PEPTÍDEOS LIGADOS À MEMBRANA DE CELULOSE

As membranas contendo os peptídeos imobilizados foram lavadas três vezes com tampão TBS (*Tris Buffered Saline* – 8 g de NaCl, 6,1 g de Tris e 0,2 g de KCl) pH 7,0 e incubadas 16 h, à temperatura ambiente, sob agitação, com solução de bloqueio (BSA 3% e Tween-20 a 0,1% diluídos em TBS). Após bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-Tween-20 a 0,1% (TBS-T) e incubadas com os soros de cavalos diluídos em TBS-T e BSA (1%) a 37°C, sob agitação, durante 90 minutos. Após lavagens, o anticorpo secundário (anti IgG cavalo) conjugado à peroxidase (Sigma, diluído 1:30000 em TBS-T) foi adicionado e mantido sob agitação por 60 minutos. A reatividade dos spots foi detectada através do emprego do substrato quimioluminescente ECL *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) e de filmes ultra-sensíveis para contraste (Hyperfilm ECL

- GE Healthcare). Os filmes foram expostos às membranas por tempo previamente padronizado em 1 minuto e o procedimento feito em sala escura. A reatividade de cada membrana foi avaliada em pelo menos três experimentos independentes.

Com o intuito de identificar e selecionar os peptídeos mais reativos, essa metodologia foi utilizada varias vezes ao longo deste trabalho, seguindo essencialmente esse protocolo. As diferenças baseiam-se nas sequências peptídicas adsorvidas nas membranas e nas diluições dos soros testados, previamente qualificados quanto sua potência em testes *in vivo*.

4.6.1 Regeneração da membrana

A fim de tornar possível sua reutilização após revelação por quimioluminescência, as membranas foram submetidas a um tratamento de regeneração. A extração dos complexos moleculares ligados aos peptídeos foi promovida com solução contendo uréia (8 M), SDS (1%) e β -mercaptoetanol (0,1%). Para remoção da uréia, lavagens com etanol (50%) e ácido acético (10%) foram feitas. Com intenção de minimizar a hidratação dos peptídeos ao final do processo, as membranas foram lavadas com metanol, secas e armazenadas a - 20°C. Estes procedimentos permitiram a reutilização das membranas por cerca de 30 vezes sem redução da reatividade.

4.7 SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunoquímica de Toxinas, na Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, coordenado pelo professor Carlos Chávez Olórtégui. Os peptídeos selecionados, determinados por imunoenaios, foram sintetizados na forma solúvel, empregando a técnica de síntese peptídica em fase sólida (SPFS), para posterior utilização como antígenos na etapa de sensibilização nos ensaios de ELISA (com peptídeos solúveis). Foram selecionados e sintetizados o peptídeo central (164 DFSGPYLPSLPTLDA 178) e o peptídeo N-terminal (22 EFVNLGANSIETDVS 36) correspondendo aos *spots* 152 e 196 das sequências de *L. laeta* e *L. gaucho*, respectivamente. Em cada sequência foi

adicionada uma região de AGC (Alanina - Glicina - Cisteína) para posterior carregamento.

Desenvolvida por MERRIFIELD (1963), a SPFS consiste em fixar o aminoácido pela porção C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel, tanto em solução aquosa quanto em solventes orgânicos, e depois alongar a cadeia peptídica (acoplamentos) em ciclos repetitivos por adições consecutivas de resíduos C-terminal ao N-terminal do aminoácido anterior.

Durante a síntese os aminoácidos foram temporariamente protegidos em sua função α -amino com o grupo Fmoc, removido em meio básico (Piperidina 20% em DMF), e as cadeias laterais, quando reativas, também protegidas por grupos estáveis (*t*-butila e tritila) em condições básicas, garantindo sua integridade durante toda a síntese da cadeia peptídica. As etapas de acoplamento e desproteção do grupamento *N*-terminal foram repetidas, alternadamente, até que o peptídeo fosse obtido, obedecendo à sequência desejada. O mesmo permaneceu ligado covalentemente ao suporte polimérico (Resina *Rink amine* - SIGMA) durante toda a síntese e na etapa final, foi liberado de seu suporte sólido e os grupos protetores das cadeias laterais também removidos por acidólise na presença de TFA. A resina ainda com os peptídeos adsorvidos foi tratada com uma solução ácida (TFA 95%, TRIS 2,5% e H₂O 2,5%), mantida sob agitação por 2 horas e centrifugada (30 minutos a 5000 rpm) para retirada do sobrenadante com os peptídeos já solubilizados. Ressuspendida em éter etílico gelado (proporção de 1:10), a resina foi lavada por 3 vezes, da mesma forma, o éter foi adicionado no sobrenadante para precipitação dos peptídeos. Finalmente, após as lavagens ao precipitado foi adicionado água destilada para solubilização e por fim liofilizado. A resina e os grupos protetores das cadeias laterais foram escolhidos de forma que pudessem ser removidos sob mesmas condições. O sintetizador ResPep SL (INTAVIS AG - *Bioanalytical Instruments*) (FIGURA 7) foi utilizado para a síntese dos peptídeos solúveis. O grau de pureza de cada um dos peptídeos foi determinado por cromatografia, usando-se o sistema HPLC (Akta Explorer 100), por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Shimadzu) com gradientes de 0 - 60% (TFA 0,1% em Acetonitrila) por 1 hora e através de espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF/TOF (Autoflex III - Bruker Daltonics Inc.).

4.8 ELISA COM PEPTÍDEOS SOLÚVEIS

Placas de microtitulação com 96 poços (Falcon) foram sensibilizadas com diferentes concentrações (2,5 - 5,0 - 25 - 50 e 100 µg/mL) dos peptídeos (5 e 7) solúveis diluídos em tampão bicarbonato de sódio (0,05M) e incubadas 16 h a 4°C. Depois de lavadas com solução de lavagem (salina Tween-20 0,05%), bloqueadas com tampão de bloqueio (caseína 2% diluída em PBS) por 1 h a 37°C, as placas foram incubadas com os soros diluídos (1:1000 - 1:10000) em tampão de incubação (caseína 0,25% e Tween-20 0,05% em PBS) nas mesmas condições. O conjugado anti IgG cavalo peroxidase (Sigma, diluído 1:30000 em tampão de incubação) foi adicionado e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, o substrato (tampão citrato pH 5,0, peróxido de hidrogênio e cromógeno orto fenildiamina – OPD) foi adicionado. A reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ (5%) e os títulos dos anticorpos determinados em função da intensidade da coloração, cuja absorbância foi lida em comprimento de onda de 490 nm por um leitor de ELISA Bio Rad 550. Todas as medições foram feitas em triplicata.

4.9 CARREAMENTO DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS A BSA

Com o objetivo de testar e escolher a melhor proteína candidata para carrear os peptídeos solúveis, foi realizado um teste de ELISA sensibilizando a placa com três proteínas de referência como carreadoras. A verificação da reatividade dos soros equinos hiperimunes (diluídos 1:10000 em tampão de incubação) foi feita através de ensaio imunoenzimático, nas quais placas (Falcon – 96 poços) foram sensibilizadas com 100 µL de solução em diferentes concentrações (2,5 - 5,0 - 50 e 100 µg/mL) das seguintes proteínas (diluídas em tampão bicarbonato - pH 9,6): OVA (Ovalbumina), BSA (Albumina de soro bovino) (CAPELLI-PEIXOTO *et al.*, 2011) e KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) (ALVARENGA *et al.*, 2010). A albumina do soro bovino (BSA) foi escolhida como proteína carreadora dos peptídeos sintéticos solúveis. Os peptídeos foram acoplados a BSA como descrito por CAPELLI-PEIXOTO *et al.*, 2010. Primeiramente, BSA (SIGMA, A-4378) diluída em PBS (tampão fosfato salino - 20 mM) pH 7,2, contendo cloreto de sódio (0,9 mM) foi ativada pela reação com sulfosuccinimidyl 4 - (N-maleimidomethyl) ciclohexano-1-

carboxilato (SMCC, Pierce Chemical - 22320), obedecendo a proporção de 5:1 de BSA para SMCC diluído em solvente orgânico (DMF). A solução foi mantida à 20°C por 2 h sob agitação, ao abrigo da luz. Para separação das proteínas não ativadas pelo SMCC foi utilizada uma coluna de filtração molecular (PD-10), equilibrada com PBS-EDTA (100 mM) pH 7,2. Foram coletadas 20 frações de 750 µl e avaliada na absorbância de 280 nm. As alíquotas do primeiro pico de leitura foram agrupadas e nelas acrescidas os peptídeos individualmente e incubadas por 2 horas à 20°C sob leve agitação, no escuro. Posteriormente foi realizado o bloqueio das cisteínas livres com a adição de solução de cisteínas (1 mM), incubadas por 20 minutos sob agitação em tubos protegidos da luz. Os peptídeos acoplados a BSA foram aliquotados e estocados a - 20 °C.

4.10 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO

Com o propósito de se obter anticorpos do *pool* de soros antiloxoscélicos de alta potência capazes de reconhecer o peptídeo 5 (DFSGPYLPSLPTLDA-AGC), uma coluna de afinidade foi preparada conjugando-se o peptídeo a um suporte de agarose (*SulfoLink® Coupling Gel* - PIERCE). Os grupos de iodoacetil sobre o gel permitiu a imobilização covalente do peptídeo 5, que permaneceu ligado através de seus grupos sulfidrílo (-SH). Posteriormente, os anticorpos antipeptídeo 5 foram obtidos em procedimentos de purificação por afinidade.

Resumidamente, o gel (2 mL) foi colocado em uma coluna de fluxo por gravidade e submetido a lavagens com tampão de acoplamento (Tris 50 mM, EDTA-Na 5 mM, pH 8,5). Após lavagem do gel, dois miligramas de peptídeo 5 foram diluídos em tampão de acoplamento e acrescentados ao gel e incubados por 15 minutos à 25 °C, sob leve agitação. O gel permaneceu por um período adicional (30 minutos) em repouso e lavado com tampão de acoplamento (três vezes o volume da coluna) para retirada dos peptídeos não adsorvidos. Sequencialmente, uma solução para bloqueio de sítios de ligação não específicos (L-cisteína - HCl 50 mM em tampão de acoplamento) foi adicionada e incubada por 30 minutos à 25 °C, sob leve agitação. O leito do gel foi lavado com solução (NaCl 1 M) para remoção do bloqueio excedente e equilibrado com PBS (0,5 M). A seguir, um volume de amostra (*pool* de soros antiloxoscélicos de alta potência) foi adicionado e incubado sob leve agitação

por 2 h à 25 °C. Após incubação, a mesma amostra foi transcorrida através do gel por duas vezes para assegurar o reconhecimento do peptídeo pelos anticorpos presentes no *pool* de soros. Os anticorpos que foram reconhecidos pelo peptídeo ficaram retidos no gel e eluídos utilizando-se um tampão de eluição (glicina - HCl 0,2 M, pH 2,8). O eluato foi neutralizado com tampão de neutralização (Tris/HCl 1 M, pH 8,5) e posteriormente, dialisado contra PBS (0,5 M, pH 7,4). Após a diálise, a dosagem protéica da solução contendo os anticorpos anti-peptídeo 5 foi realizada diretamente a 280 nm. A solução foi estocada a - 20 °C para posteriores ensaios de ELISA indireto.

4.11 ELISA PARA TITULAR ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO

Com intuito de verificar o título de anticorpos anti-peptídeo 5, placas de microtitulação com 96 poços (Falcon) foram imobilizadas com 100 µL (5 µg/mL) das amostras de diferentes venenos (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *Tityus serrulatus*) e peptídeo Pep5-BSA (25 µg/mL) diluídas em tampão bicarbonato de sódio (0,05M) e incubadas 16 h a 4°C. Depois de lavadas com solução de lavagem (salina Tween-20 0,05%), bloqueadas com tampão de bloqueio (caseína 2% diluída em PBS) por 1 h a 37°C, as placas foram incubadas com concentrações crescentes (0,3 - 0,6 - 1,25 - 2,5 - 5 e 10 µg/mL) de anti-peptídeo 5 (obtido a partir do *pool* de soros antiloxoscélicos de alta potência) diluído em tampão de incubação (caseína 0,25% e Tween-20 0,05% em PBS) nas mesmas condições. O conjugado anti IgG cavalo peroxidase (Sigma, diluído 1:30000 em tampão de incubação) foi adicionado e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens, o substrato (tampão citrato pH 5,0, peróxido de hidrogênio e cromógeno orto fenildiamina – OPD) foi adicionado. A reação foi interrompida pela adição de 20 µL de H₂SO₄ (5%) e os títulos dos anticorpos determinados em função da intensidade da coloração, cuja absorbância foi lida em comprimento de onda de 490 nm por um leitor de ELISA Bio Rad 550. Todas as medições foram feitas em triplicata.

Para constatar a possibilidade de reação cruzada dos anticorpos anti-peptídeo com antígenos de algumas espécies de artrópodes, placas de ELISA foram sensibilizadas com os venenos de aranhas *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, de escorpião *Tityus serrulatus* e de abelha *Apis mellifera* na concentração de 5

µg/mL de cada veneno e com os peptídeos Pep5-BSA, Pep7-BSA e peptídeo central de TsNTxP (TLKKGSSGYCAWPAC), na concentração de 25 µg/mL de cada peptídeo (100 µL por poço). As placas foram incubadas com anti-peptídeo 5 e mAb 12 (anticorpo monoclonal produzido contra os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) a 5 µg/mL e *pool* de soros antiloxoscélicos de alta potência diluído (1:1000). Os ensaios foram conduzidos segundo as condições descritas anteriormente.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância (ANOVA) de experimentos fatoriais foi usada para análises estatísticas dos resultados obtidos pelos ensaios de ELISA. O teste F foi realizado e combinações das variâncias amostrais dentro de cada grupo ou fator foram consideradas em nível de significância aquelas com $p < 0,01$. O teste Tukey foi usado para comparar os fatores dois a dois e foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas com $p < 0,05$. As análises foram feitas usando o programa ASS/STAT- 7.2 (SILVA & AZEVEDO, 2009).

4.13 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

O modelo tridimensional e a localização dos peptídeos selecionados por imunoensaios foram analisados em estrutura tridimensional das proteínas obtida por homologia usando o programa *SWISS-MODEL* (PEITSCH, 1995). A estrutura tridimensional de SMase I (código no PDB: 1xx1) de *L. laeta* (MURAKAMI *et al.*, 2005) obtida por cristalografia de raios-X foi usada como molde. A visualização dos peptídeos na estrutura tridimensional das proteínas foi feita usando o programa *Viewer Lite* 5.0 (Accelrys Inc[®]). O alinhamento das sequências estudadas e os cálculos de hidrofobicidade e acessibilidade dos peptídeos ao solvente foram feitos utilizando o programa *JOY* (MIZUGUCHI *et al.*, 1998). A massa molecular e o ponto isoelétrico teóricos dos peptídeos foram calculados usando o programa *PEPTIDESMASS* (WILKINS *et al.*, 1997).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DOS VENENOS

Para avaliar o perfil proteico e confirmar a presença de proteínas dermonecróticas nas amostras dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, uma análise eletroforética foi realizada e revelou a presença de um grande número de bandas com massa moleculares bem distintas. A avaliação comparativa dos perfis proteicos mostrou diferenças não só no número como também na intensidade das bandas, embora, todos apresentassem componentes na região de 30-35 kDa, massas correspondentes às proteínas fosfolipases-D (FIGURA 8).

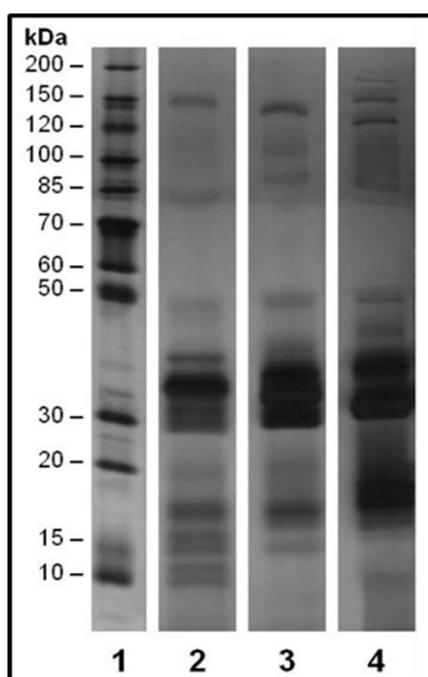


FIGURA 8 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS VENENOS. Amostras dos venenos contendo 2 µg de proteínas de *L. intermedia* (2), *L. gaucho* (3) e *L. laeta* (4) foram submetidas à eletroforese vertical de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12,5% em condições não redutoras. Após a migração, as bandas foram visualizadas pela impregnação com nitrato de prata.

5.2 ELISA INDIRETO COM VENENOS

As nove amostras de soros antiloxoscélicos e um soro pré-imune, previamente avaliados por testes de soroneutralização *in vivo* (determinação do potencial neutralizante) foram testados por ELISA indireto usando como antígenos o *pool* de venenos de três espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gauchoi* e *L. laeta*), os mesmos venenos usados no processo de hiperimunização dos equídeos.

De acordo com os resultados apresentados no GRÁFICO 2, todos os soros com exceção do pré-imune, apresentaram títulos de anticorpos frente aos venenos. Contudo, com as médias obtidas não foi possível identificar quais soros constituíam os de alta ou baixa potência ou se as diferenças entre elas seriam significativas, mesmo nas diferentes diluições testadas.

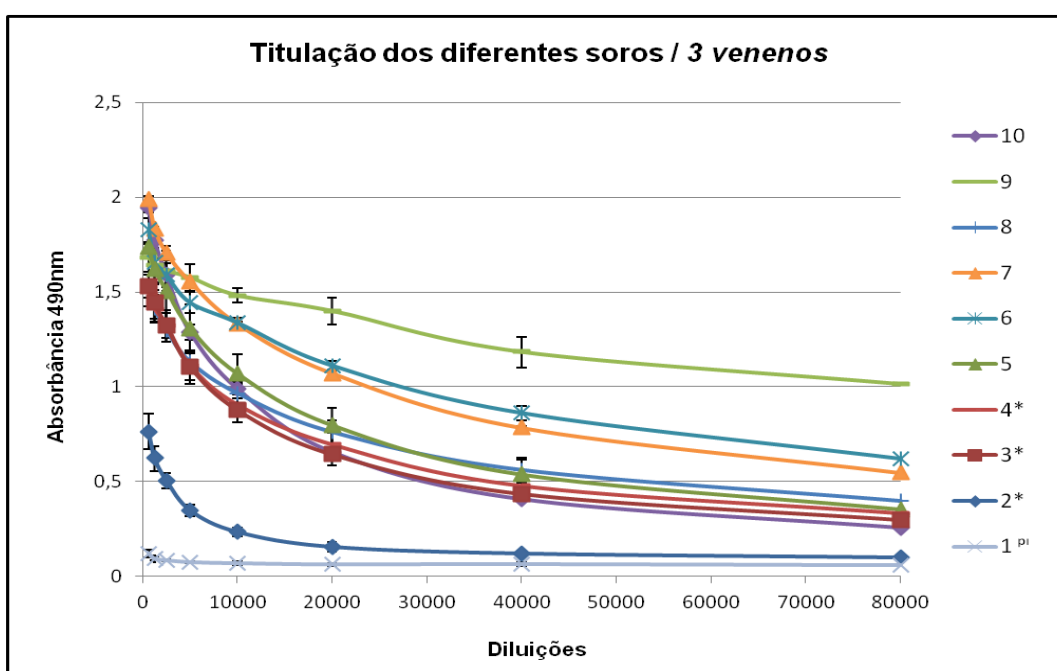


GRÁFICO 2 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTE AOS TRÊS VENENOS. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 μ L (2,5 μ g/mL) das amostras do *pool* de venenos (mistura dos três venenos) e, posteriormente, incubadas com diluições crescentes (1:625 - 1:80000) dos soros antiloxoscélicos (2 - 10) e pré-imune (1^{PI}). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em duplicata e os resultados expressos com a média de três ensaios. * Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Como os dados apresentaram variação contínua, avaliamos os mesmos através de análise de variância (ANOVA) onde consideramos um delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial (10x8), sendo analisados o fator 1 - soro (10) e fator 2 - diluição (8) (ANEXO). A análise foi complementada pelo teste Tukey (ANEXO).

TABELA 5 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM O *POOL* DE VENENOS

Fonte de variação (FV)	Grau de liberdade (GL = FV-1)	Estatística do teste F
Fator 1 (F1)	9	762.8167 *
Fator 2 (F2)	7	746.7257 *
Int. F1 x F2	63	17.1071 *

NOTA: A tabela mostra os valores obtidos pela análise de variância (ANOVA) aplicando o teste de experimento fatorial calculado pelo programa de análise estatística ASS/STAT. Fator 1 - Soros (10), Fator 2 - Diluição dos soros (8), F1xF2 - Interação das médias dos fatores analisados. * significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Verificou-se com os elementos apresentados pelo experimento fatorial (TABELA 5) que existe diferenças estatisticamente significativas e interação entre as médias dos fatores, ou pelo menos entre uma delas em cada fator analisado. Apenas com esta análise não foi possível inferir quais médias apresentaram diferenças significativas. Contudo, quando o teste considerou apenas as médias do fator 1 (soros), a média do soro 8 (alta potência) não mostrou diferença significativa dos soros 3 e 4 de baixa potência (GRÁFICO 3).

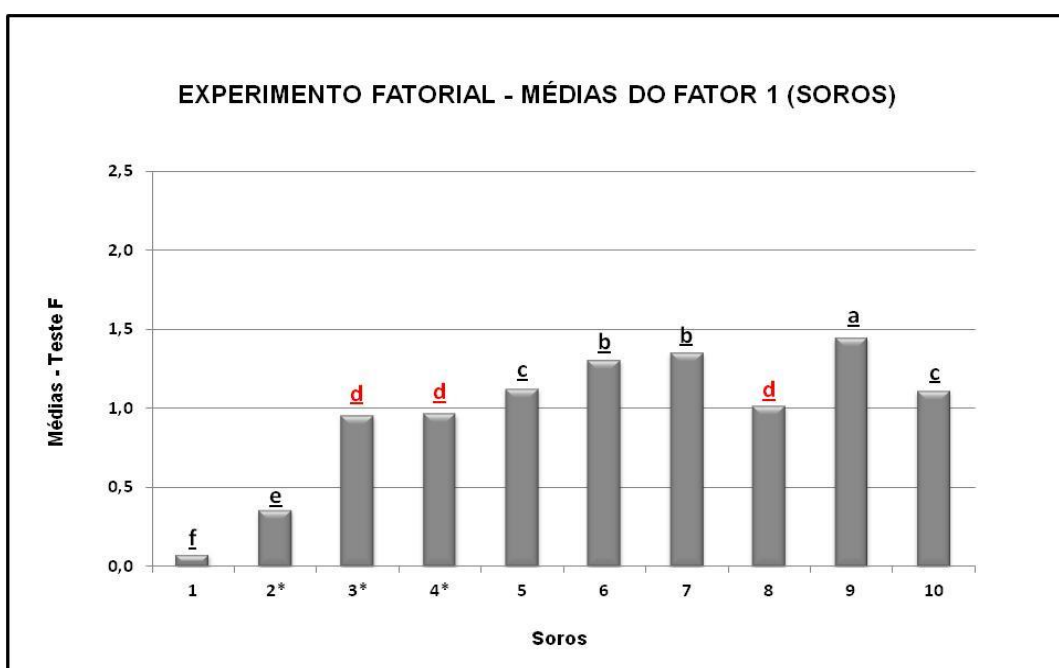


GRÁFICO 3 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO FATOR 1 (SOROS). Médias obtidas pelo experimento fatorial aplicado considerando apenas as interações entre as médias do fator 1 (Soros). As médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As letras em vermelho indicam as médias dos soros 3 e 4 de baixa potência estatisticamente semelhantes as do soro 8 de alta potência. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste F ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Além disso, quando feitas comparações múltiplas entre os fatores 1 e 2, ou seja, considerando as interações entre todas as médias dos soros e diluições aplicadas, foi possível observar variações entre todas as médias e condições avaliadas das interações, e alguns soros de alta potência não diferem estatisticamente dos soros de baixa potência. Como mostra o GRÁFICO 4, quando aplicada a diluição 1:5000, os soros de baixa potência 3 e 4 foram considerados estatisticamente iguais aos soros de alta potência 5, 8 e 10. O GRÁFICO 4 apresentou apenas duas das oito diluições analisadas, os dados completos encontram-se em anexo. Resultado semelhante foi apresentado quando outras diluições foram aplicadas.

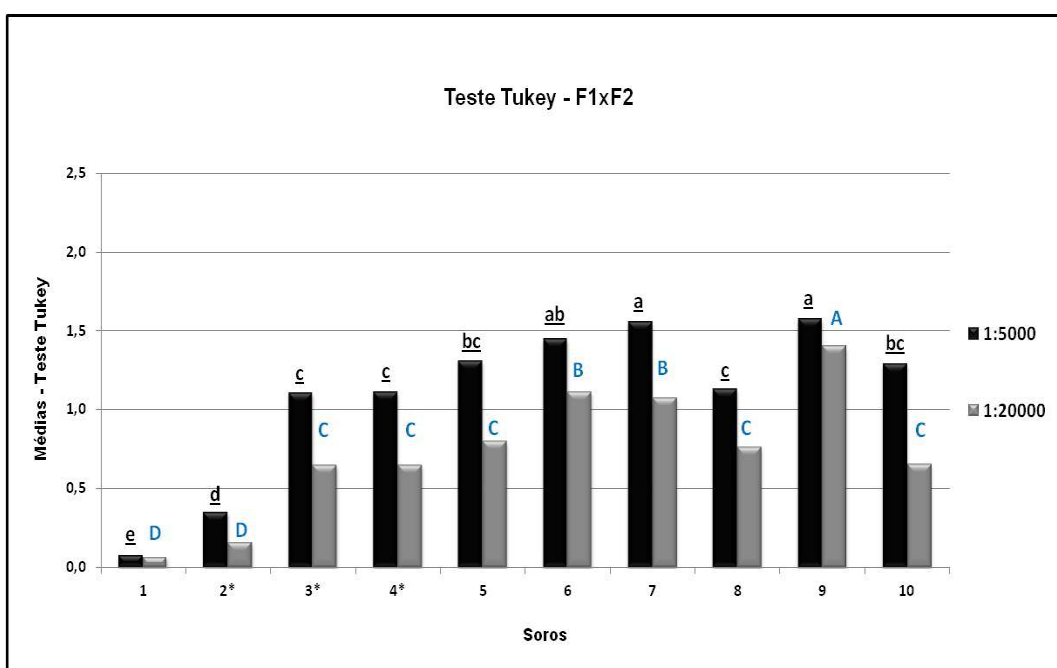


GRÁFICO 4 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1xF2 (Soros x Diluição). As colunas indicam as médias obtidas pelo teste para cada diluição analisada e estas indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. As letras minúsculas sublinhadas representam as diferenças para médias obtidas com a diluição dos soros 1:5000, as maiúsculas em azul para diluição 1:20000. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Como os testes de soroneutralização *in vivo* foram realizados usando apenas o veneno de *L. intermedia*, optou-se por sensibilizar as placas de microtitulação somente com o mesmo a fim de verificar uma possível correlação.

O número de diluições aplicadas foi reduzido, visto que em ensaios antecedentes com diluições inferiores, a diferença significativa entre os soros de alta e baixa potência era ainda menor.

Como mostrado no GRÁFICO 5, com exceção do soro pré-imune, todos os soros reconheceram o veneno de *L. intermedia*. Houve variação no perfil apresentado e aspecto semelhante aos resultados já mencionados com o teste usando o *pool* de venenos, e da mesma forma, não foi possível concluir se as variações apresentadas eram significativas, então o experimento fatorial foi aplicado.

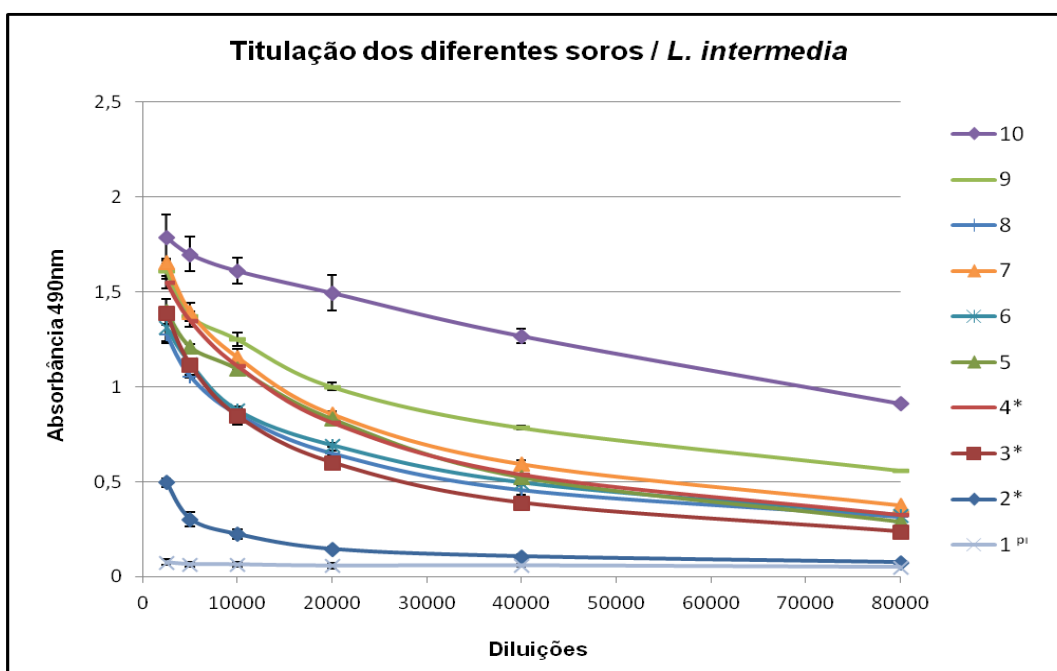


GRÁFICO 5 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTE AO VENENO DE *L. intermedia*. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 μ L (2,5 μ g/mL) de veneno de *L. intermedia* e, posteriormente, incubadas com diluições crescentes (1:2500 - 1:80000) dos soros antiloxoscélicos (2 - 10) e pré-imune (1^{PI}). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em duplicata e os resultados expressos com a média de três ensaios. * Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

O teste F foi realizado e combinações das variâncias amostrais dentro de cada grupo foram consideradas em esquema fatorial (10x6), sendo analisados o fator 1 - soro (10) e fator 2 - diluição (6) (TABELA 6).

TABELA 6 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM VENENO DE *L. intermedia*

Fonte de variação (FV)	Grau de liberdade (GL = FV-1)	Estatística do teste F
Fator 1 (F1)	9	1845.6447*
Fator 2 (F2)	5	2180.4017*
Int. F1 x F2	45	47.0457*

NOTA: A tabela mostra os valores obtidos pela análise de variância (ANOVA) aplicando o teste de experimento fatorial calculado pelo programa de análise estatística ASSISTAT. Fator 1 - Soros (10), Fator 2 - Diluição dos soros (6), F1xF2 - Interação das médias dos fatores analisados. * significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Os dados mostraram interação e diferenças estatisticamente significativas entre as médias, ou pelo menos entre uma delas. Quando o teste considerou apenas as médias do fator 1, a média do soro 3 de baixa potência não indicou diferença significativa dos soros 6 e 8 de alta potência (GRÁFICO 6).

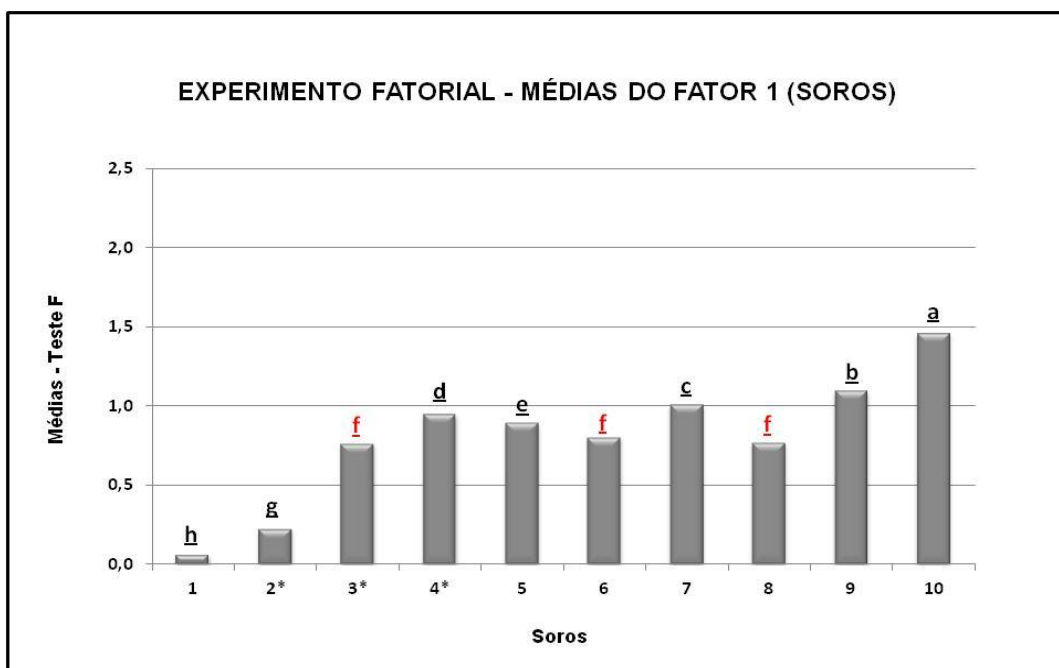


GRÁFICO 6 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO FATOR 1 (SOROS). Médias obtidas pelo experimento fatorial aplicado considerando apenas as interações entre as médias do fator 1 (Soros). As médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As letras em vermelho indicam as médias dos soros 6 e 8 de alta potência estatisticamente semelhantes as do soro 3 de baixa potência. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste F ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Ademais, quando feitas as comparações entre os fatores 1 e 2, ou seja, considerando as interações entre os soros e as diluições aplicadas, foram observadas da mesma forma, que com o *pool* de venenos, variações entre todas as médias e em todas as condições das interações avaliadas (GRÁFICO 7). O GRÁFICO 7 apresentou apenas duas das seis diluições analisadas, os dados completos encontram-se em anexo.

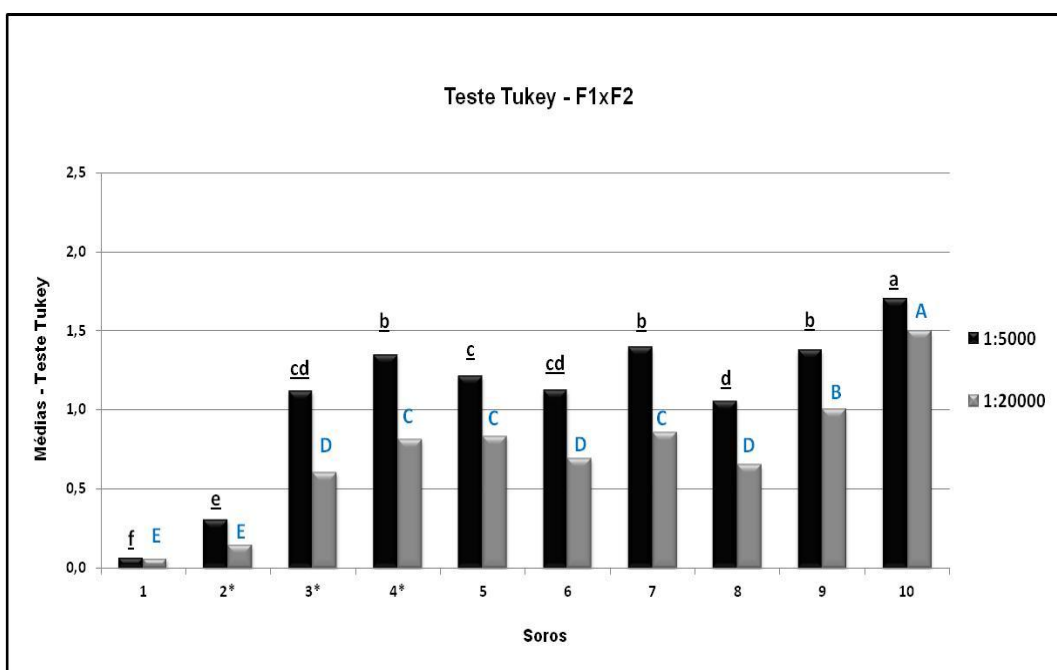


GRÁFICO 7 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1xF2 (Soros x Diluição). As colunas indicam as médias obtidas pelo teste para cada diluição analisada e estas indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. As letras minúsculas sublinhadas representam as diferenças para médias obtidas com a diluição dos soros 1:5000, as maiúsculas em azul para diluição 1:20000. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Visto as variações das médias entre os ensaios de ELISA, com o *pool* e apenas um veneno, foi verificado que os antígenos aplicados na sensibilização das placas influenciaram nos resultados obtidos. Desta forma, foi realizada uma comparação entre os resultados para avaliar as evidências estatísticas de que as médias entre eles fossem distintas.

O esquema fatorial (10x6x2) foi aplicado, considerando as médias do fator 1 - soro (10), fator 2 - diluição (6) e fator 3 - veneno (2), e a diferença significativa entre as médias analisada. Em todas as análises em que os fatores foram avaliados individualmente, as médias foram estatisticamente diferentes. Porém, quando considerada a interação entre todos os fatores (F1xF2, F1xF3, F2xF3 e F1x2x3), apenas a interação entre F2xF3 (diluição x veneno) não foi significativa (TABELA 7).

TABELA 7 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DOS TESTES DE ELISA COM *POOL* DE VENENOS E DE *L. intermedia*

Fonte de variação (FV)	Grau de liberdade (GL = FV-1)			Estatística do teste F		
	<i>Pool</i> de venenos	<i>L. intermedia</i>	<i>Pool / Li</i>	<i>Pool</i> de venenos	<i>L. intermedia</i>	<i>Pool / Li</i>
Fator 1 (F1)	9	9	9	762.8167*	1845.6447*	1527.7761*
Fator 2 (F2)	7	5	5	746.7257*	2180.4017*	1940.6358*
Fator 3 (F3)	1	1	1	-	-	15.6253*
Int. F1 x F2	63	45	45	17.1071*	47.0457*	38.6346*
Int. F1 x F3	-	-	9	-	-	178.9862*
Int. F2 x F3	-	-	5	-	-	1.2313 ^{ns}
Int. F1 x F2 x F3	-	-	45	-	-	5.7280**

NOTA: A tabela mostra os valores obtidos pela análise de variância (ANOVA) aplicando o teste de experimento fatorial calculado pelo programa de análise estatística ASSISTAT. Fator 1 - Soros, Fator 2 - Diluição dos soros, Fator 3 - venenos (*pool* ou *L. intermedia*). F1xF2; F1xF3; F2xF3 e F1xF2xF3 interações entre as médias dos fatores analisados. * significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); ^{ns} não significativo ($p \geq 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados no GRÁFICO 8 quando as médias dos soros foram analisadas considerando o veneno aplicado (F1xF3), apenas as dos soros pré-imune e de baixa potência 2 e 3, não foram influenciadas pelo antígeno usado, sendo considerados semelhantes em ambas situações. Com relação aos demais soros, todos tiveram suas médias influenciadas pelo antígeno, e apenas as médias dos soros 4 (baixa potência) e 10 (alta potência) foram melhores quando usado somente o veneno de *L. intermedia*. Além disso, quando consideramos a ordem de significância das médias comparadas, observamos maior diferença significativa entre os soros de alta e baixa potência quando o *pool* de venenos foi usado (FIGURA 9).

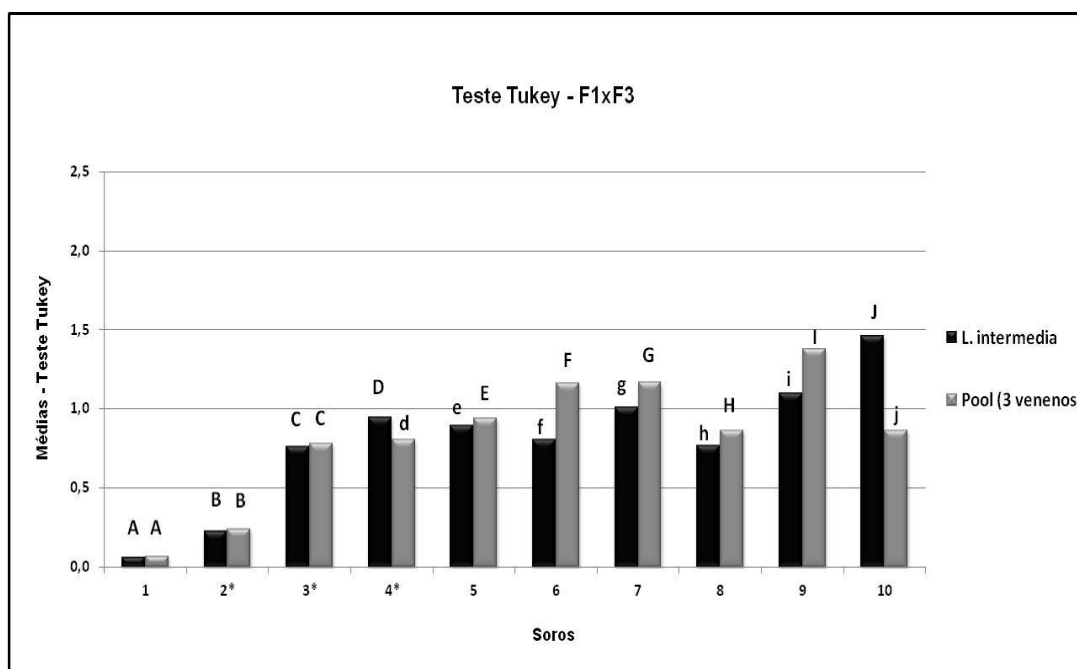


GRÁFICO 8 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E VENENO. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1XF3 (Soros x Veneno). As colunas indicam as médias obtidas pelo teste para cada veneno aplicado (*L. intermedia* ou *pool* dos 3 venenos). As letras maiúsculas iguais indicam médias com variações não significantes entre os ensaios com os distintos antígenos. As letras minúsculas indicam médias inferiores e com diferenças significativas para o mesmo soro testado frente aos dois antígenos. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Teste Tukey – F1xF3					
<i>L. intermedia</i>			Pool - 3 venenos		
	10	1.4623 a	9	1.3777 a	
	9	1.0969 b	7	1.1652 b	
10	7	1.0063 c	6	1.1605 b	9
9	4	0.9472 cd	5	0.9411 c	7 - 6
7 - 4*	5	0.8927 d	8	0.8653 d	5
4* - 5	6	0.8035 e	10	0.8634 d	8 - 10 - 4*
6 - 8 - 3*	8	0.7684 e	4	0.8068 de	4* - 3*
2*	3	0.7634 e	3	0.7803 e	2*
1	2	0.2252 f	2	0.2434 f	1
	1	0.0625 g	1	0.0691 g	

FIGURA 9 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E VENENO. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1xF3 (Soros x Veneno). Análise dos resultados colocados em ordem de significância. As colunas indicam as média obtidas pelo teste para cada veneno (*L. intermedia* ou *pool* dos 3 venenos) usado e estas indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. As barras laterais indicam médias com variações não significantes. Os retângulos indicam as médias dos soros de baixa potência estatisticamente semelhantes aos soros alta potência. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados não foi possível estabelecer uma correlação direta entre os títulos apresentados pelos métodos de ELISA usando os venenos brutos como antígenos e a potência neutralizante dos soros. Na tentativa de favorecer esta relação optou-se pelo uso de uma proteína dermonecrótica recombinante LiD1 como antígeno na etapa de imobilização das placas de microtitulação. Para este ensaio, os soros foram testadas apenas em 4 diluições.

Como mostrado no GRÁFICO 9, com exceção do soro pré-imune, todos os soros reconheceram a proteína LiD1. Houve variação no perfil apresentado e aspecto semelhante aos resultados já citados com os outros antígenos testados, e do mesmo modo, não foi possível afirmar se as variações apresentadas eram significativas, então o experimento fatorial foi aplicado.

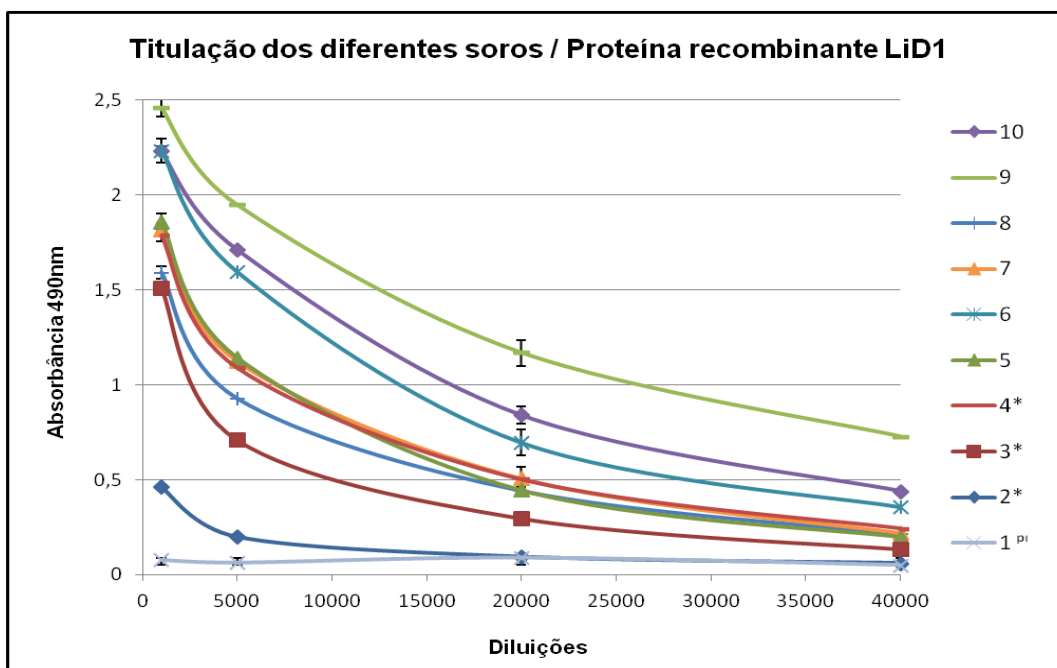


GRÁFICO 9 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTA A PROTEÍNA RECOMBINANTE LiD1. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 μ L (2,5 μ g/mL) de proteína dermonecrótica recombinante LiD1 do veneno de *L. intermedia* e, posteriormente, incubadas com diferentes diluições (1:1000 - 1:5000 - 1:20000 - 1:40000) dos soros antiloxoscélicos (2 - 10) e pré-imune (1^{PI}). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

O teste F foi realizado e combinações das variâncias amostrais dentro de cada grupo foram consideradas em esquema fatorial (10x4), sendo analisados o fator 1 - soro (10) e fator 2 - diluição (4) (TABELA 8).

TABELA 8 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM PROTEÍNA RECOMBINANTE LiD1

Fonte de variação (FV)	Grau de liberdade (GL = FV-1)	Estatística do teste F
Fator 1 (F1)	9	2715.3634*
Fator 2 (F2)	3	11142.9252*
Int. F1 x F2	27	262.5201*

NOTA: A tabela mostra os valores obtidos pela análise de variância (ANOVA) aplicando o teste de experimento fatorial calculado pelo programa de análise estatística ASSISTAT. Fator 1 - Soros (10), Fator 2 - Diluição dos soros (4), F1xF2 - Interação das médias dos fatores analisados. * significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Os dados mostraram interação e diferenças estatisticamente significativas entre as médias, ou pelo menos entre uma delas. Quando o teste ponderou apenas as médias do fator 1, sem considerar a interação com o fator 2 (diluição), a média do soro 4 de baixa potência não apresentou diferença significativa dos soros 5 e 7 de alta potência (GRÁFICO 10).

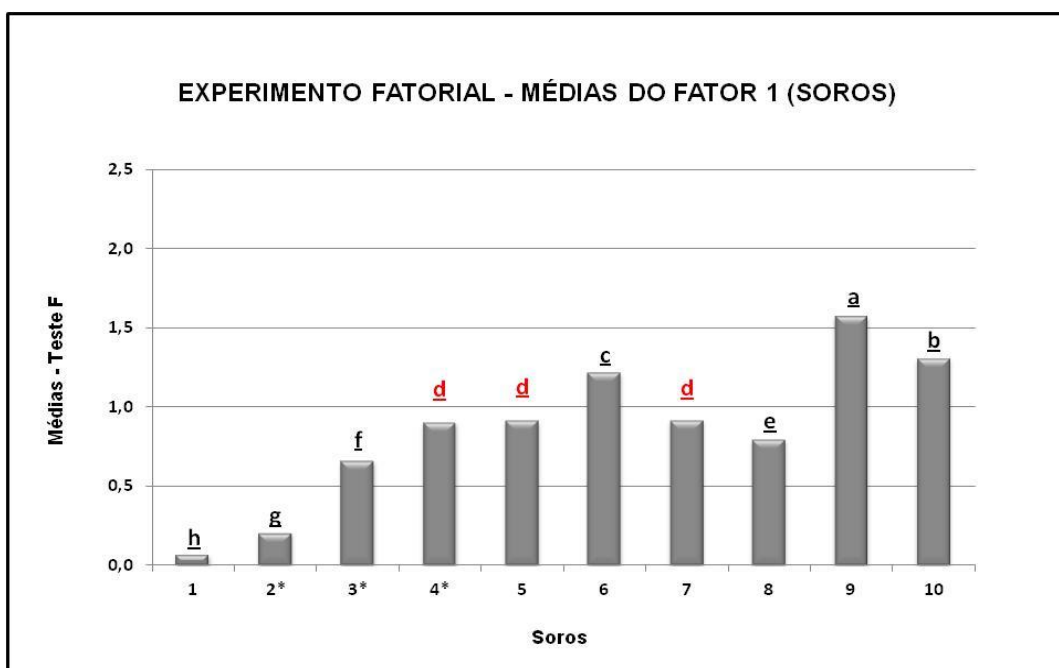


GRÁFICO 10 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO FATOR 1 (SOROS). Médias obtidas pelo experimento fatorial aplicado considerando apenas as interações entre as médias do fator 1 (Soros). As médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As letras em vermelho indicam as médias dos soros 5 e 7 de alta potência estatisticamente semelhantes as do soro 4 de baixa potência. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste F ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Considerando as interações entre os soros e as diluições aplicadas (Fator 1x2), foram observadas da mesma forma, que com o *pool* de venenos e com apenas o veneno de *L. intermedia*, variações entre todas as médias e em todas as condições das interações avaliadas (GRÁFICO 11).

O GRÁFICO 11 apresentou apenas as médias com as diluições analisadas que apresentaram maior diferença significativa entre os soros de alta e baixa potência. Contudo, mesmo utilizando apenas uma proteína dermonecrótica representativa de um dos venenos, não foi possível estabelecer uma correlação direta com os títulos apresentados por todos os soros testados pelo método de ELISA e os resultados obtidos pelos testes *in vivo*.

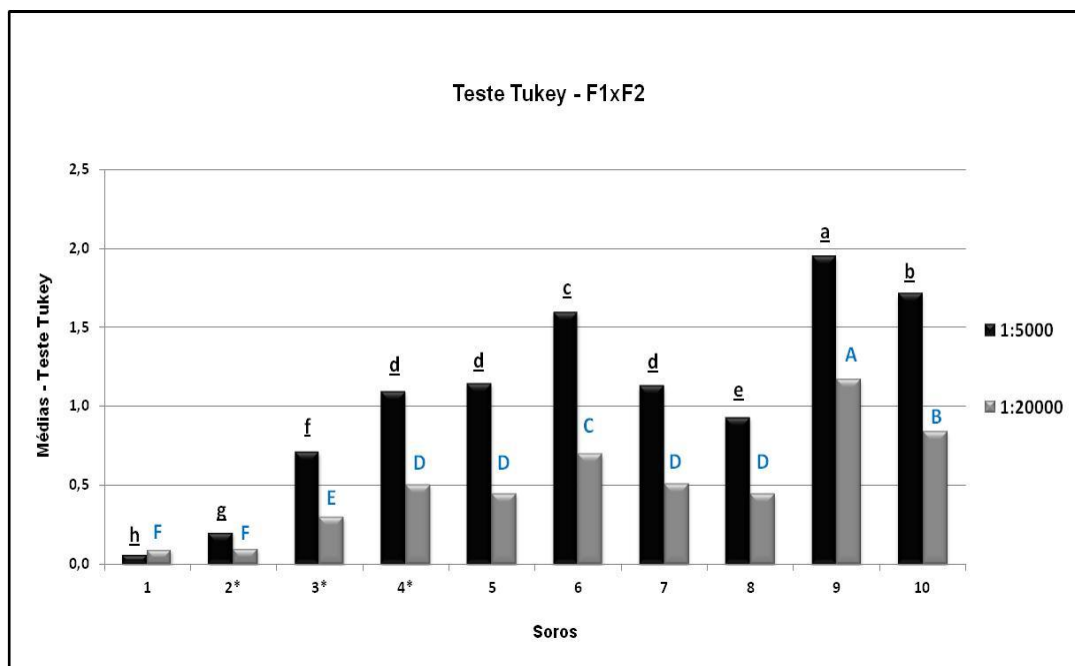


GRÁFICO 11 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1xF2 (Soros x Diluição). As colunas indicam as médias obtidas pelo teste para cada diluição analisada e estas indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. As letras minúsculas sublinhadas representam as diferenças para médias obtidas com a diluição dos soros 1:5000, as maiúsculas em azul para diluição 1:20000. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Todos os dados usados para a construção das tabelas e figuras das análises estatísticas encontram-se em anexo.

5.3 MAPEAMENTO DE EPITOPOS DAS PROTEÍNAS DERMONECRÓTICAS

Com intuito de identificar epitopos antigênicos das três proteínas dermonecróticas (SMase I-1xx1, LiD1 e A1H-LoxGa), o método de *Spot* síntese foi utilizado. Foram construídos sobre uma membrana de celulose 278 peptídeos lineares, com 15 aminoácidos cada, sobrepostos por 12 resíduos abrangendo as sequências primárias de proteínas fosfolipases-D de três espécies de *Loxosceles*. Após a síntese, os peptídeos permaneceram adsorvidos sobre a membrana e ensaios imunológicos para o reconhecimento dos epitopos foram realizados.

Cinco soros antiloxoscélicos considerados por testes *in vivo* como de alta potência (6, 8 e 9), dois de baixa potência (2 e 3) e um pré-imune foram avaliados. Os soros diluídos (1:5000) foram testados e a ligação dos anticorpos com os peptídeos foi detectada pela adição de um segundo anticorpo (IgG anti-cavalo conjugado à peroxidase). A reatividade dos soros frente a todos os peptídeos é mostrada na FIGURA 10A.

Os peptídeos, de uma maneira geral, foram melhor reconhecidos pelos soros de alta potência. Para a proteína dermonecrótica do veneno de *L. intermédia* foram observadas três regiões imunodominantes, uma parte N-terminal, uma região central e parte da região C-terminal da proteína. Um padrão semelhante foi encontrado para a proteína de *L. gaucho* na região N-terminal, no entanto, a parte C-terminal reconhecida nesta toxina se divide em duas regiões. Já para a proteína dermonecrótica de *L. laeta* pelo menos quatro regiões imunodominantes foram encontradas. A localização dos *spots* reativos foi apresentada na FIGURA 10A. Dentre as sequências imunorreativas, alguns peptídeos foram selecionados para novas caracterizações, estes indicados na FIGURA 10B, que se trata um esquema reproduzindo a distribuição dos peptídeos sintetizados sobre a membrana de celulose pelo método de *Spot* sínteses.

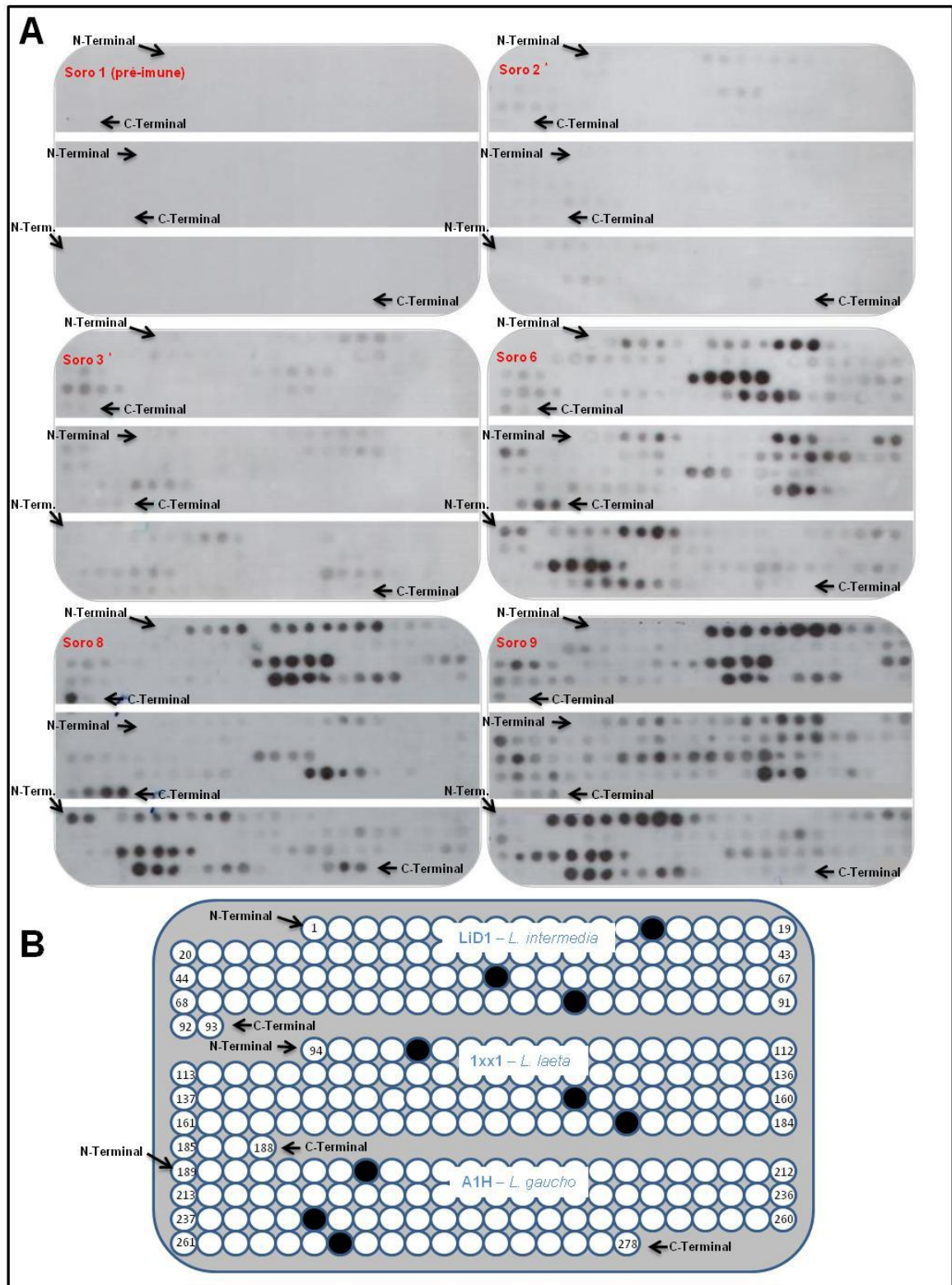


FIGURA 10 - REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE TRES PROTEÍNAS DERMONECRÓTICAS TESTADOS COM SOROS ANTILOXOSCÉLICOS. (A) Reconhecimento dos peptídeos por anticorpos presentes em cinco soros antiloxoscélicos e pré-imune diluídos (1:5000), detectados pela adição do anticorpo secundário anti IgG cavalo (1:30000) conjugado à peroxidase. (B) Esquema de distribuição dos peptídeos sintetizados sobre membrana de celulose pelo método de *Spot* sínteses. As setas indicam as porções N-terminal e C-terminal das sequências aminoácidas das diferentes proteínas. Foram selecionados três peptídeos mais reativos de cada proteína, com os *Spots* reativos indicados no esquema (*spot* preto). *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*.

A TABELA 9 mostra a posição dos peptídeos selecionados na estrutura primária das proteínas analisadas, a sequência, a massa molecular teórica, o ponto isoelétrico bem como a hidrofobicidade e acessibilidade dos peptídeos ao solvente. Podemos observar que todos os peptídeos, com exceção do peptídeo 4 (pI 9.61), apresentam características ácidas. O menos hidrofóbico é o peptídeo 8 e o mais acessível ao solvente, ou seja, o mais exposto, o peptídeo 5.

TABELA 9 - SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS REATIVOS SELECIONADOS

Pep [#]	Sequência	Resíduos	MM (Da)	pI	Hidro. (%)	Ac. (%)
1	N S I E T D V S F D D N A N P	29 - 43	1637.63	3.37	33	33
2	H P E L M D K V G H D F S G N	155 - 169	1682.83	5.21	33	67
3	A L D A G V D G I M T N Y P D	236 - 250	1551.69	3.42	46	47
4	D N R R P I W N L A H M V N A	2 - 16	1807.06	9.61	53	33
5	D F S G P Y L P S L P T L D A	164 - 178	1592.77	3.56	53	80
6	L D V G V D G I M T N Y P N V	242 - 256	1606.81	3.56	53	40
7	E F V N L G A N S I E T D V S	22 - 36	1594.70	3.57	40	47
8	D K V G H D F S G N D D I S D	160 - 174	1620.61	3.97	20	67
9	D A L D A G V D G I M T N Y P	235 - 249	1551.69	3.42	46	53
C*	M L P Y I V L V L G S W S V L	-	1690.12	5.27	-	-

NOTA: A tabela mostra a sequência dos peptídeos reativos selecionados pelos imunoenaios com soros antiloxoscélicos de diferentes potências. A localização de cada um dos peptídeos na estrutura primária das proteínas dermonecróticas (Resíduos), a massa molecular (MM) e o ponto isoelétrico (pI), calculados pelo programa *PEPTIDES MASS*, a hidrofobicidade (Hidro.) e a acessibilidade (Ac.), analisados com programa *JOY*, também foram mostrados. [#] Peptídeos reativos das proteínas de cada espécie, *L. intermedia* (peptídeos 1, 2 e 3), *L. laeta* (4, 5 e 6) e *L. gaucho* (7, 8 e 9). * Peptídeo controle negativo.

5.4 CONFIRMAÇÃO DOS EPITOPOS REATIVOS

Uma nova síntese paralela de peptídeos sobre membrana de celulose foi realizada e as sequências dos 9 peptídeos selecionados e mais um peptídeo como controle negativo foram imobilizadas e usadas nos imunoenaios frente a todos os soros antiloxoscélicos (FIGURA 11B).

Como mostrado na FIGURA 11A, apenas o soro pré-imune, diferentemente dos demais soros, não reconheceu peptídeos em pelo menos uma das diluições testadas. Além disso, apenas os soros de alta potencia (soros 5 a 10) foram capazes de reconhecer peptídeos quando testados em ambas as diluições.

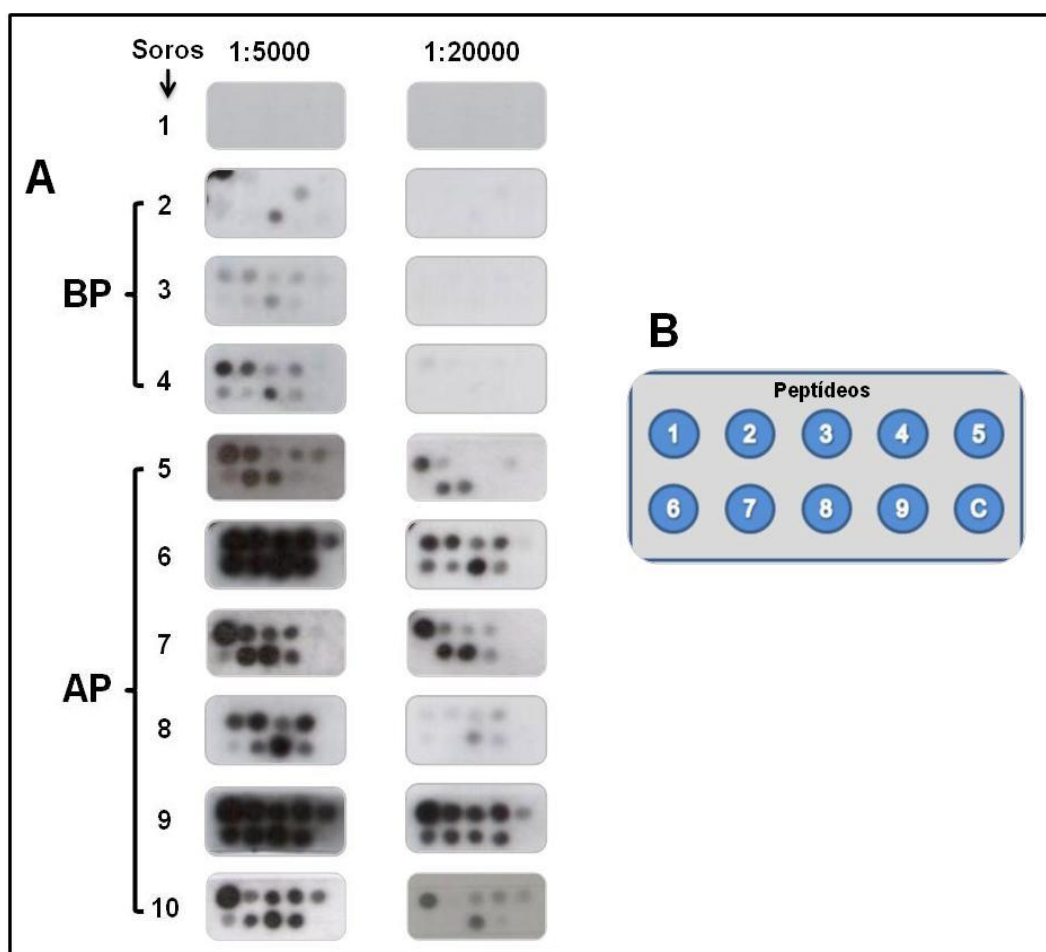


FIGURA 11 - REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS E SINTETIZADOS EM NOVA MEMBRANA DE CELULOSE. (A) Reconhecimento dos peptídeos por anticorpos presentes nos soros antiloxoscélicos (soros 2 a 10) de diferentes potenciais de neutralização *in vivo* e pré-imune (soro 1) diluídos (1:5000 e 1:20000), detectados pela adição do anticorpo secundário anti IgG cavalo (1:30000) conjugado à peroxidase. (B) Esquema de distribuição dos 9 peptídeos selecionados e um peptídeo controle negativo (peptídeo C) sintetizados sobre nova membrana de celulose pelo método de *Spot* sínteses. BP e AP indicam os soros qualificados como de baixa e alta potencia após testes de soroneutralização *in vivo*, respectivamente.

A TABELA 10 apresenta a análise da frequência com que os peptídeos foram reconhecidos por soros de diferentes potências.

De acordo com os dados apresentados na TABELA 10, o reconhecimento dos peptídeos pelos soros foi mais frequente quando estes testados em menor diluição, além disso, apenas os peptídeos 5 e 7 não foram reconhecidos pelos soros de baixa potência quando testados em diluição inferior.

TABELA 10 - ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS REATIVOS SELECIONADOS

Peptídeo [#]	Sequência	Frequência (1:5000)		Frequência (1:20000)	
		AP	BP	AP	BP
1	N S I E T D V S F D D N A N P	6/6	2/3	6/6	0/3
2	H P E L M D K V G H D F S G N	6/6	2/3	5/6	0/3
3	A L D A G V D G I M T N Y P D	5/6	2/3	5/6	0/3
4	D N R R P I W N L A H M V N A	6/6	3/3	5/6	0/3
5	D F S G P Y L P S L P T L D A	4/6	0/3	3/6	0/3
6	L D V G V D G I M T N Y P N V	5/6	1/3	3/6	0/3
7	E F V N L G A N S I E T D V S	6/6	0/3	5/6	0/3
8	D K V G H D F S G N D D I S D	6/6	3/3	6/6	0/3
9	D A L D A G V D G I M T N Y P	5/6	1/3	5/6	0/3
C*	M L P Y I V L V L G S W S V L	0/6	0/3	0/6	0/3

NOTA: A tabela mostra a análise de frequência dos peptídeos selecionados pelos imunoenaios com soros antiloxoscélicos diluídos (1:5000 e 1:20000) de diferentes potências determinadas por soroneutralização *in vivo*. [#] Três peptídeos mais reativos das proteínas de cada espécie, *L. intermedia* (peptídeos 1, 2 e 3), *L. laeta* (4, 5 e 6) e *L. gaucho* (7, 8 e 9). * Peptídeo controle negativo. Foram testados 6 e 3 soros de alta (AP) e baixa (BP) potência, respectivamente.

5.5 ESTUDO E LOCALIZAÇÃO DOS EPITOPOS REATIVOS

Com o propósito de comparar as sequências aminoacídicas das diferentes proteínas estudadas e visualizar a homologia entre elas, foi realizado o alinhamento de suas sequências primárias.

A FIGURA 12 mostra o alinhamento das proteínas mapeadas pela técnica de *spot*. O alinhamento permitiu a visualização dos peptídeos na estrutura primária das proteínas estudadas e a comparação entre as sequências das diferentes espécies.

A homologia entre as três proteínas analisadas foi 61,4%. Foi encontrada grande homologia entre as sequências das espécies de *L. intermedia* e *L. gaucho*, em consenso com 99,6%, diferindo por apenas um aminoácido (L e W110). Homologia entre as sequências peptídicas selecionadas (9 peptídeos) também foi observada (TABELA 11).

A FIGURA 13 apresenta o alinhamento estrutural de SMase I e LiD1, e destacados em retângulos coloridos, estão os epítopos selecionados mais reativos reconhecidos pelos soros antiloxoscélicos.

De acordo com a análise estrutural realizada pelo algoritmo JOY, o peptídeo 5 é o mais exposto, 12 de seus 15 resíduos são acessíveis ao solvente (80 %), os peptídeos 2 e 8 apresentam 10 resíduos acessíveis (67 %), o peptídeo 9 expõe 8 resíduos (53 %), os peptídeos 3 e 7, exibem 7 resíduos acessíveis (47 %), o peptídeo 6 apresenta 6 resíduos acessíveis (40 %), e os peptídeos 1 e 4, os menos expostos, apresentam apenas 5 resíduos acessíveis (33 %).

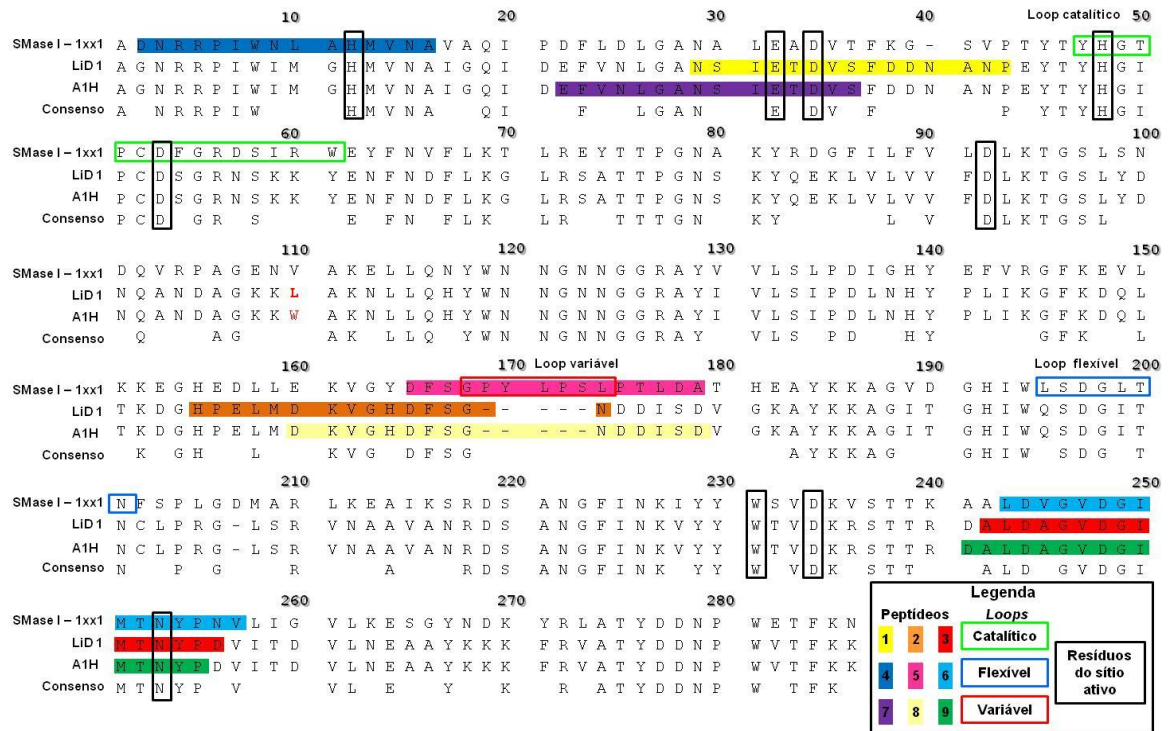


FIGURA 12 - ALINHAMENTO DAS TRÊS PROTEÍNAS ESTUDADAS. Alinhamento das sequências das proteínas SMase I – 1xx1, LiD1 e A1H, dos venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*, respectivamente. Os resíduos do sítio ativo (H12 - histidina 12, E32 - ácido glutâmico 32, D34 - ácido aspártico 34, H47 - histidina 47, D52 - ácido aspártico 52, D91 - ácido aspártico 91, Trp230 - triptofano 230, D233 - ácido aspártico 233 e N252 - asparagina 252) estão marcados com retângulo preto. Os loops catalítico, flexível e variável estão marcados por retângulos verde, azul e vermelho, respectivamente. Também foram marcados os peptídeos 1 (amarelo), 2 (laranja), 3 (vermelho), 4 (azul escuro), 5 (rosa), 6 (azul claro), 7 (roxo), 8 (amarelo claro) e 9 (verde escuro).



FIGURA 13 - ALINHAMENTO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS ESTUDADAS. Alinhamento estrutural das proteínas SMase I-1xx1, LiD1 e A1H, dos venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*, respectivamente. As sequências foram submetidas ao algoritmo JOY. Em letra minúscula e maiúscula estão os aminoácidos acessíveis e inacessíveis ao solvente, respectivamente, em vermelho os presentes em alfa-hélice, em azul em fita beta, ç-cisteína em ponte dissulfeto, em negrito e sublinhado os resíduos responsáveis pela formação de ponte de hidrogênio. Os resíduos do sítio ativo estão marcados com retângulo preto e os peptídeos selecionados em retângulos coloridos.

TABELA 11 - HOMOLOGIA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS SELECIONADAS

Pep [#]	Sequência	Homologia (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	N S I E T D V S F D D N A N P	100	-	-	-	-	-	53	-	-
2	H P E L M D K V G H D F S G N	-	100	-	-	27	-	-	67	-
3	A L D A G V D G I M T N Y P D	-	-	100	-	-	80	-	-	93
4	D N R R P I W N L A H M V N A	-	-	-	100	-	-	-	-	-
5	D F S G P Y L P S L P T L D A	-	27	-	-	100	-	-	27	-
6	L D V G V D G I M T N Y P N V	-	-	80	-	-	100	-	-	80
7	E F V N L G A N S I E T D V S	53	-	-	-	-	-	100	-	-
8	D K V G H D F S G N D D I S D	-	67	-	-	27	-	-	100	-
9	D A L D A G V D G I M T N Y P	-	-	93	-	-	80	-	-	100
C*	M L P Y I V L V L G S W S V L	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: A tabela mostra a homologia entre as sequências dos peptídeos selecionados pelos imunoensaios com soros antiloxoscélicos de diferentes potências determinadas por soroneutralização *in vivo*. [#]Peptídeos mais reativos das proteínas de cada espécie, *L. intermedia* (peptídeos 1, 2 e 3), *L. laeta* (4, 5 e 6) e *L. gaucho* (7, 8 e 9). * Peptídeo controle negativo.

Com o objetivo de visualizar o posicionamento dos peptídeos reativos na estrutura tridimensional de suas respectivas proteínas, a partir dos dados de cristalografia de raio-X, de uma proteína com atividade fosfolipase-D de *L. laeta* (SMase 1 – PDB:1xx1), de MURAKAMI *et al.*, 2005, realizamos a modelagem molecular das proteínas analisadas (FIGURA 14).

Verificou-se na FIGURA 14 a disposição e o posicionamento na estrutura tridimensional de todos os 9 peptídeos reativos das proteínas dermonecróticas. Além disso, foi possível visualizar a exposição das sequências e confirmar visualmente que o peptídeo 5 é o mais exposto dentre os estudados.

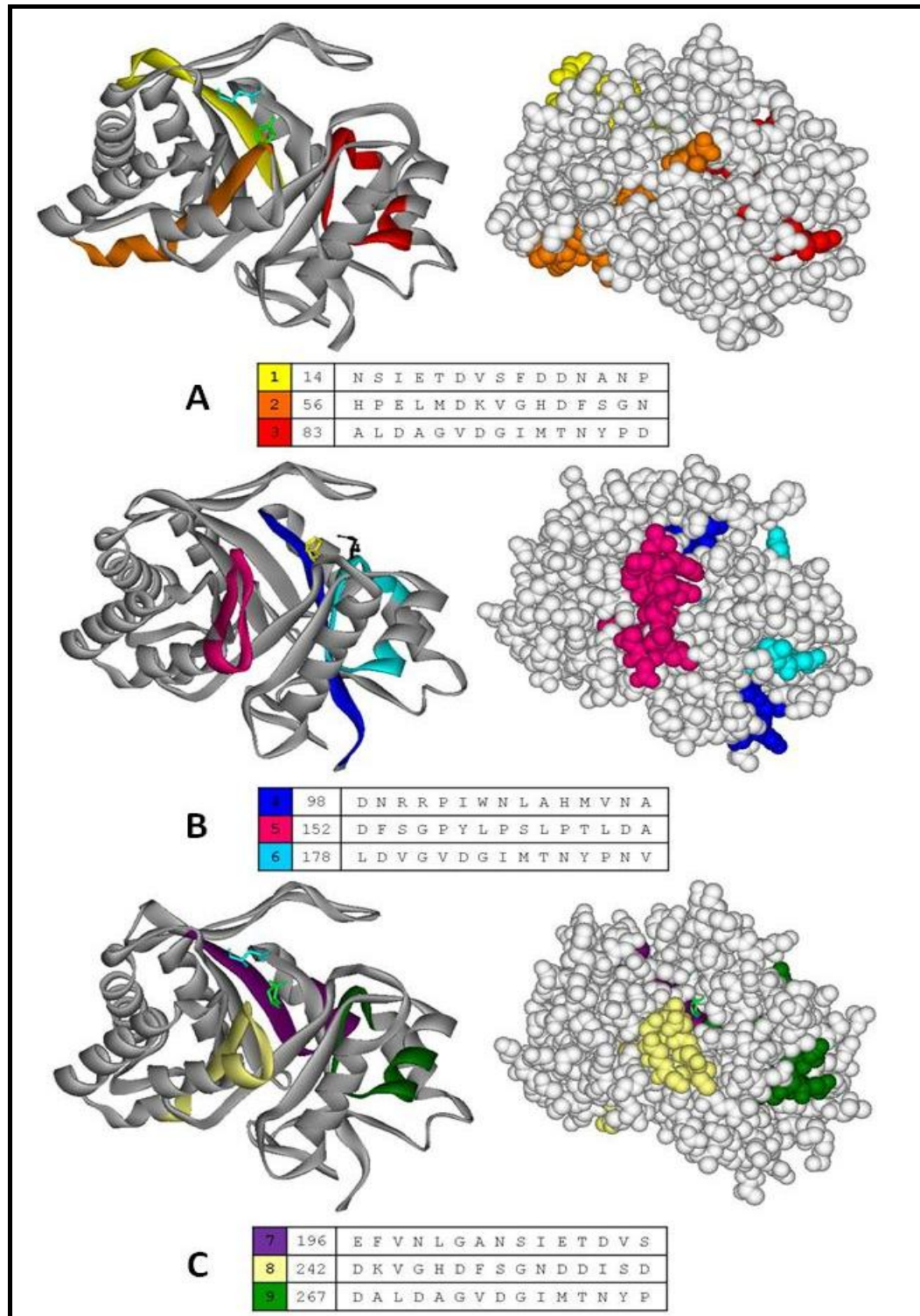


FIGURA 14 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS ANALISADAS E O POSICIONAMENTO DOS PEPTÍDEOS REATIVOS. Obtido por modelagem molecular utilizando o programa SWISS-MODEL (PEITSCH, 1995) a partir da proteína SMase I (acesso PDB: 1XX1) (MURAKAMI *et al.*, 2005). O programa Viewer Lite foi utilizado para sua visualização. As tabelas indicam os peptídeos (1 - 9), sua localização na membrana e suas sequências, respectivamente. (A) Estrutura tridimensional de LiD 1 - *L. intermedia* (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002), cedida por (FELICORI *et al.*, 2006); (B) Estrutura tridimensional de SMase I (1xx1) - *L. laeta* (MURAKAMI *et al.*, 2005); (C) Estrutura tridimensional A1H - LoxGa - *L. gaucho* (SILVESTRE *et al.*, 2005). Resíduos do sítio ativo presentes nos peptídeos selecionados foram destacados em amarelo, verde claro, azul claro e preto, a histidina (H12), o ácido glutâmico (E32), o ácido glutâmico (E34) e asparagina (N252), respectivamente.

5.6 SÍNTESE QUÍMICA E ACOPLAMENTO DOS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS

Uma vez identificados e localizados os epitopos, a próxima etapa do presente trabalho foi realizar a síntese química destes peptídeos na sua forma solúvel para posterior utilização como antígenos na etapa de sensibilização de ELISA indireto.

Tendo em vista as distintas propriedades físico-químicas e imunorreativas apresentadas pelos peptídeos, apenas dois foram considerados para a síntese química. O peptídeo 5, o mais exposto e não reconhecido pelos soros de baixa potência, mesmo em baixa diluição, e o peptídeo 7 que da mesma forma não foi reconhecido e além disso, apresenta resíduos conservados presentes na região N-terminal importantes para a atividade catalítica das proteínas.

Foram sintetizados os peptídeos 5 (DFSGPYLPSLPTLDA) e o 7 (EFVNLGANSIETDVS) correspondendo aos resíduos 164-178 e 22-36 (TABELA 9) das sequências de *L. laeta* e *L. gaucho*, respectivamente. Em cada sequência foi adicionada uma região de AGC (Alanina - Glicina - Cisteína) para posterior carregamento.

Inicialmente foi verificada a capacidade dos peptídeos de serem reconhecidos pelos diferentes soros quando adsorvidos, não acoplados diretamente sobre a placa de ELISA. Para isso, placas de microtitulação foram sensibilizadas com os peptídeos (5, 7 e 5+7) e testadas frente a todos os soros diluídos. Em seguida, foram adicionados anticorpos secundários (IgG anti- cavalo conjugados à peroxidase) e a reação foi revelada com o substrato específico. O veneno de *L. intermedia* (2,5 µg/mL) foi usado como controle positivo dos soros testados.

Albumina bovina (BSA), *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) e Ovalbumina (OVA) foram usadas para sensibilizar as placas em seguida foram adicionados os soros. O veneno de *L. intermedia* (2,5µg/mL) foi usado como controle positivo dos soros testados. Não foi observado o reconhecimento das moléculas carreadoras testadas pelos soros hiperimunes (GRÁFICO 13). A molécula BSA foi escolhida como proteína carreadora dos peptídeos (5 e 7) sintéticos solúveis.

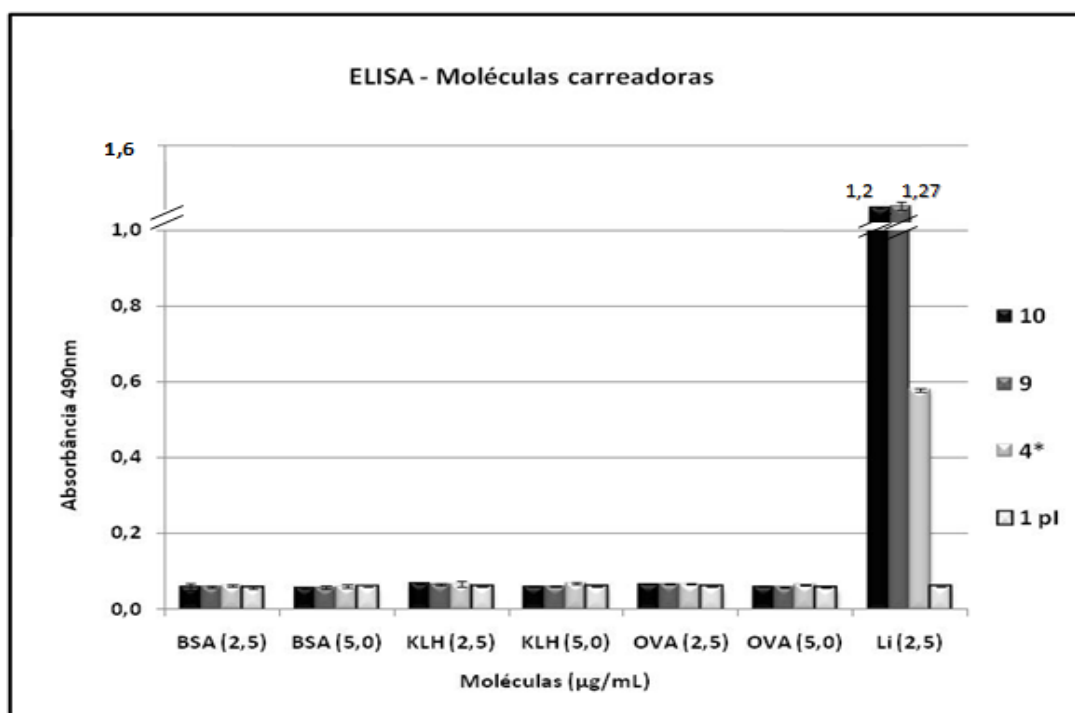


GRÁFICO 13 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM DIFERENTES MOLÉCULAS CANDIDATAS AO CARREAMENTO. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (2,5 e 5,0 µg/mL) com BSA (Albumina bovina), KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) e OVA (Ovalbumina) e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos (1:10000) e pré-imune (1^{Pi}). O veneno de *L. intermedia* (2,5 µg/mL) foi usado como controle positivo. As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*.

A fim de confirmar o não reconhecimento desta molécula pelos anticorpos presentes nos soros, placas foram sensibilizadas com maiores concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) de BSA e soros de diferentes potências foram analisados. Como verificado no GRÁFICO 14, a BSA não foi reconhecida pelos soros testados, mesmo quando usada em altas concentrações para a sensibilização das placas.

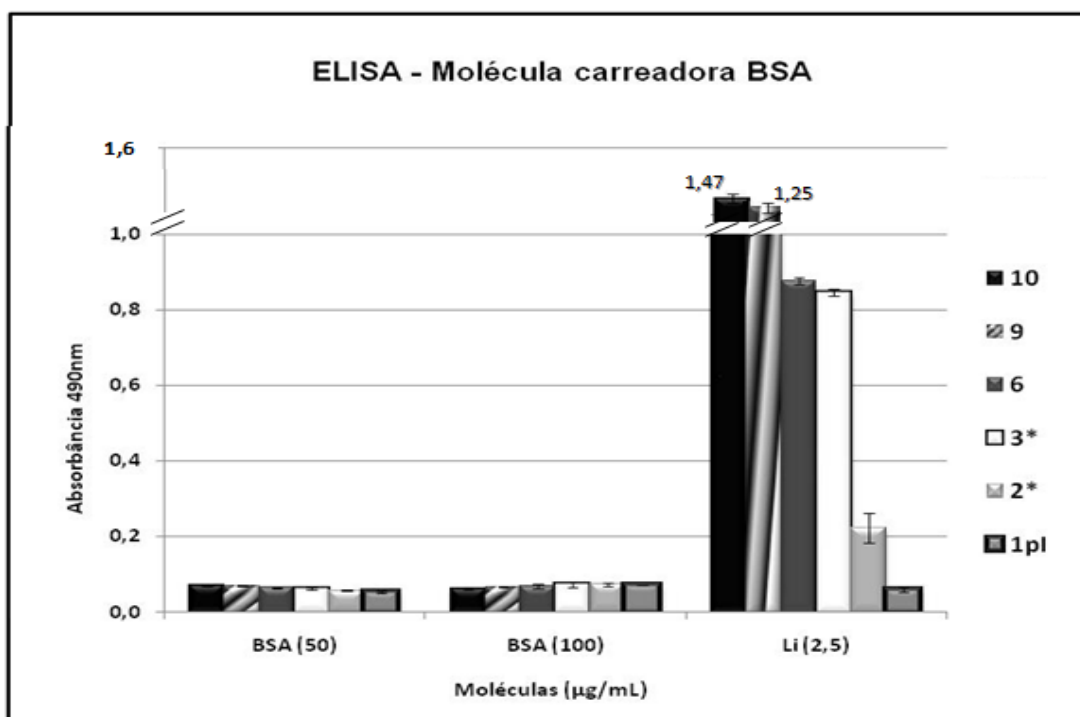


GRÁFICO 14 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM MOLÉCULA CARREADORA - BSA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 μL (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) de molécula carreadoras BSA (Albumina bovina) e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos e pré-imune (1^{Pl}) diluídos (1:10000). O veneno de *L. intermedia* (2,5 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo. As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*.

5.7 ELISA INDIRETO COM OS PEPTÍDEOS SOLÚVEIS CARREADOS A BSA

Após definição da molécula carreadora mais apropriada para o carregamento dos peptídeos solúveis, uma série de ensaios foi realizada com objetivo de padronizar as condições dos testes de ELISA usando os peptídeos carreados e deste modo, tentar diferenciar o potencial dos soros testados. Foram avaliadas diferentes condições, variando o peptídeo usado, sua concentração, bem como a diluição dos soros testados.

Inicialmente, foram consideradas as variáveis de concentração (2,5 - 5 - 25 e 50 µg/mL) e os peptídeos (Pep5-BSA e Pep7-BSA) usados na sensibilização das placas. A diluição dos soros foi mantida (1:10000).

Os resultados obtidos são mostrados no GRÁFICO 15.

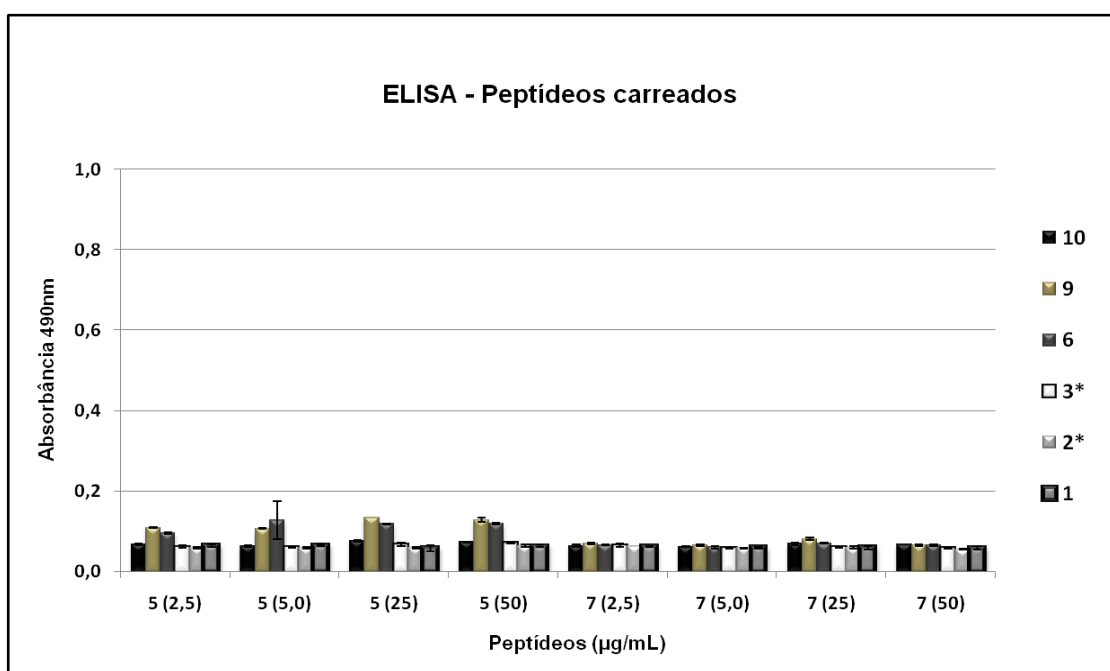


GRÁFICO 15 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEOS CARREADOS A BSA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (2,5 - 5,0 - 25 e 50 µg/mL) de solução contendo peptídeos solúveis (Pep5-BSA e Pep7-BSA) carreados a BSA (Albumina bovina) e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos e pré-imune (soro 1) diluídos (1:10000). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os dados mostraram diferenças nos resultados de acordo com o peptídeo utilizado, sendo apenas o peptídeo Pep5-BSA, reconhecido por soros de alta potência em todas as concentrações testadas.

O peptídeo Pep5-BSA foi escolhido para os próximos ensaios. A diluição dos soros foi reduzida e a concentração do peptídeo elevada com o intuito de aumentar a reatividade e a diferença entre as médias dos soros com potências distintas.

Como observado no GRÁFICO 16 nenhum soro de baixa potência reconheceu o peptídeo Pep5-BSA, mesmo elevando a concentração. A diluição dos soros influenciou diretamente no reconhecimento do peptídeo pelos anticorpos, visto que quando testados 1:2000 a reatividade em alguns casos foi (3,7 vezes) maior que 1:5000 na mesma concentração. Além disso, quando dobrada a concentração do peptídeo sem modificar a diluição dos soros a reatividade não sofreu grandes alterações. Apenas um soro (8) de alta potência não reconheceu o peptídeo.

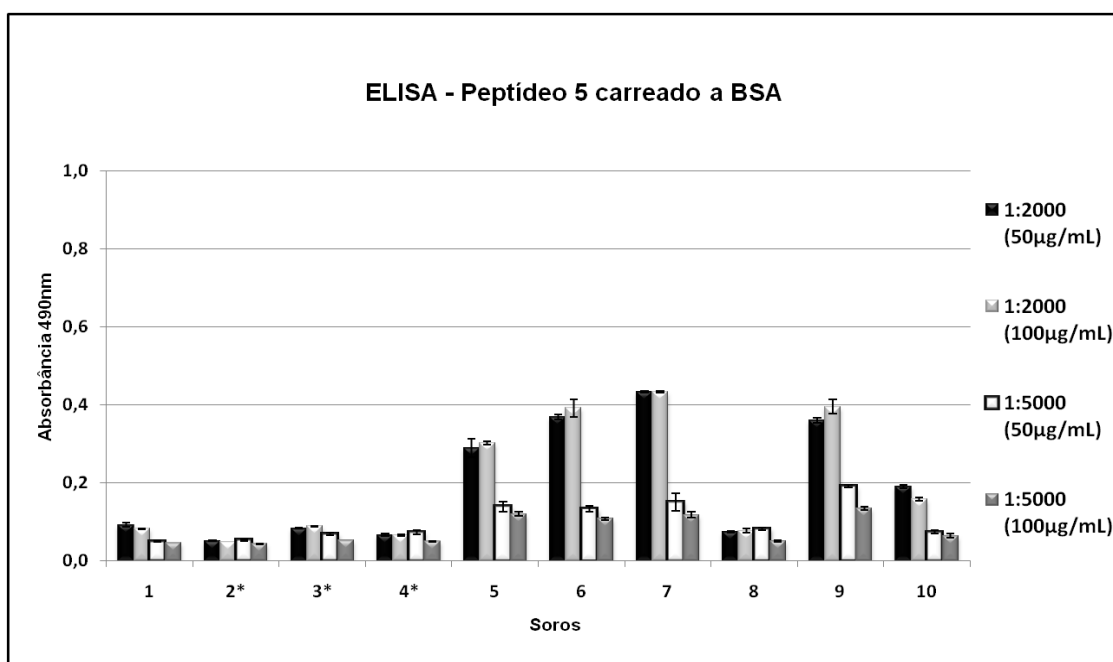


GRÁFICO 16 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEO 5 CARREGADO A BSA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (50 e 100 µg/mL) de solução contendo peptídeos solúveis carregados a BSA (Albumina bovina) e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos e pré-imune (soro 1) diluídos (1:2000 e 1:5000). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Como mostrado no GRÁFICO 15, mesmo testados em diluição de 1:10000 alguns soros de alta potência foram capazes de reconhecer o peptídeo Pep5-BSA a 25 µg/mL, assim verificou-se a absorbância dos soros (1:2000) usando o peptídeo Pep5-BSA na mesma concentração. Foram novamente testados o peptídeo Pep7-BSA e a combinação deles (Pep5+7-BSA).

Mesmo reduzindo a diluição, os peptídeos não foram reconhecidos por soros de baixa potência, apenas um soro de alta potência não reconheceu o peptídeo Pep5-BSA e a combinação dos peptídeos Pep5+7-BSA. O peptídeo Pep7-BSA também passou a ser reconhecido apenas por alguns soros (5, 7, 9 e 10) de alta potência quando usados nesta diluição (GRÁFICO 17).

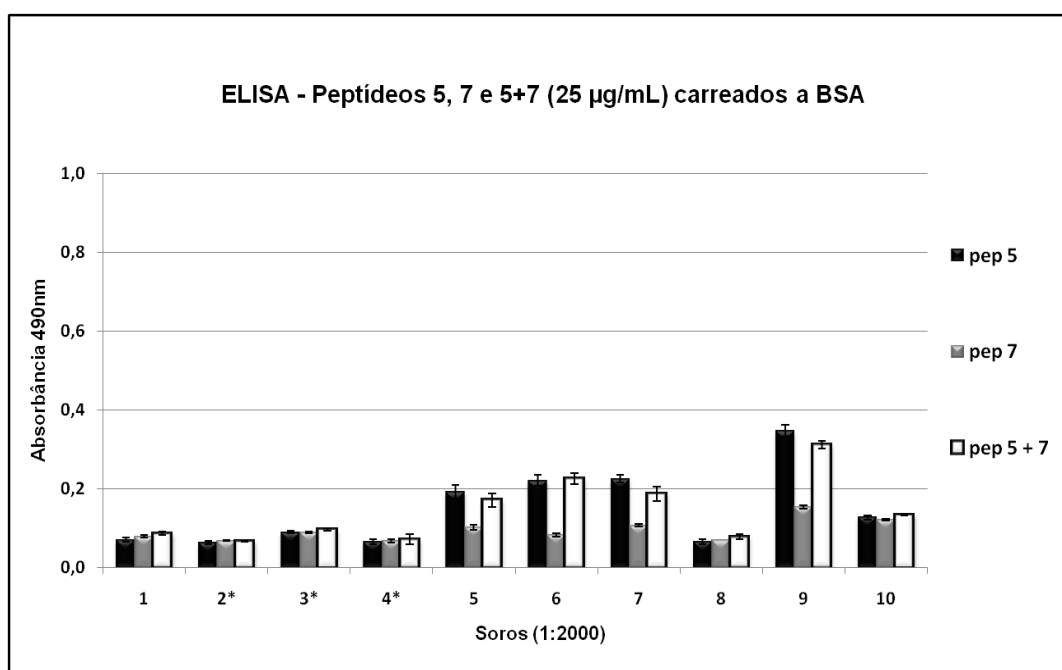


GRÁFICO 17 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEOS CARREADOS A BSA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (25 µg/mL) de solução contendo peptídeos (5 - 7 e 5+7) solúveis carreados a BSA (Albumina bovina) e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos e pré-imune (soro 1) diluídos (1:2000). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

De acordo com o GRÁFICO 18 quando reduzida ainda mais a diluição dos soros (1:1000) todos de alta potência passaram a apresentar reatividade frente aos peptídeos Pep5-BSA e Pep5+7-BSA, e somente um soro de alta potência não reconheceu o peptídeo Pep7-BSA. Além disso, não foi observada a reatividade dos soros de baixa potência.

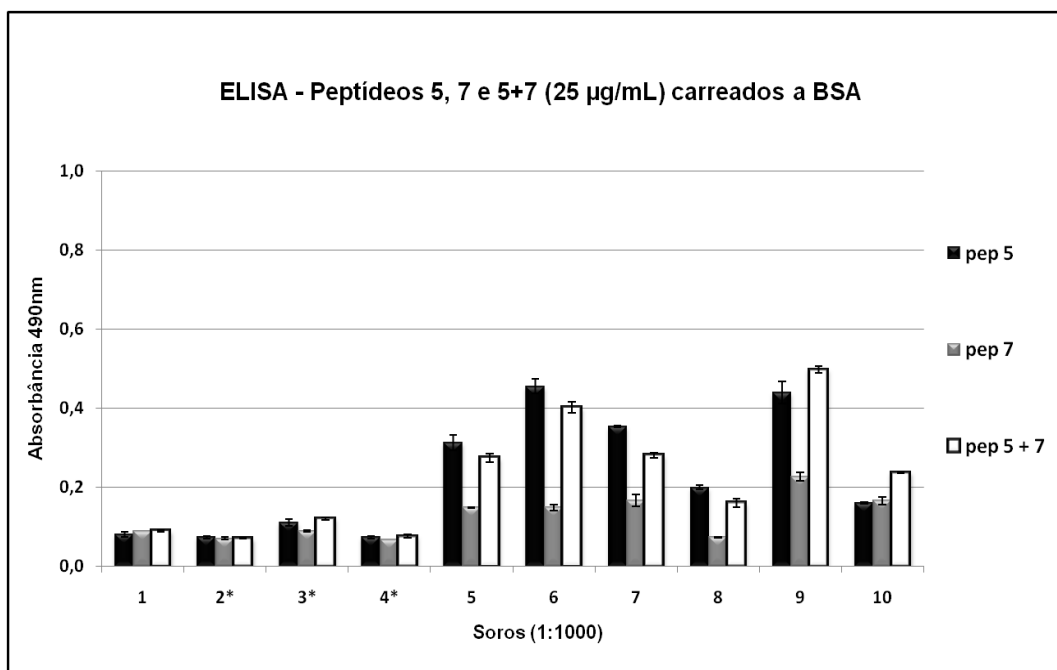


GRÁFICO 18 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEOS CARREADOS A BSA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (25 µg/mL) de solução contendo peptídeos (5 - 7 e 5+7) solúveis carreados a BSA (Albumina bovina) e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos e pré-imune (soro 1) diluídos (1:1000). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Para verificar se houve diferenças significativas entre as médias dos soros de alta e baixa potência, análise estatística foi realizada e combinações das variâncias amostrais dentro de cada grupo foram consideradas em esquema fatorial (10x2x3), sendo analisados o fator 1 - soro (10), fator 2 - diluição (2) e o fator 3 - peptídeos (3).

Os dados mostram interação e diferenças estatisticamente significativas entre as médias, ou pelo menos entre uma delas (TABELA 12).

TABELA 12 - EXPERIMENTO FATORIAL DAS MÉDIAS DO TESTE DE ELISA COM OS DIFERENTES PEPTÍDEOS

Fonte de variação (FV)	Grau de liberdade (GL = FV-1)	Estatística do teste F
Fator 1 (F1)	9	1753.3018*
Fator 2 (F2)	1	2135.3290*
Fator 3 (F3)	2	1375.1744*
Int. F1 x F2	9	159.1877*
Int. F1 x F3	18	186.3831*
Int. F2 x F3	2	137.3818*
Int. F1 x F2 x F3	18	24.1094*

NOTA: A tabela mostra os valores obtidos pela análise de variância (ANOVA) aplicando o teste de experimento fatorial calculado pelo programa de análise estatística ASSISTAT. Fator 1 - Soros (10), Fator 2 - Diluição dos soros (2), Fator 3 - Peptídeos usados na sensibilização (3). F1xF2; F1xF3; F2xF3 e F1xF2xF3 interações entre as médias dos fatores analisados. * significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

Foram feitas comparações entre todos os fatores considerando as interações entre os soros, diluições aplicadas e os peptídeos utilizados na sensibilização.

Inicialmente, considerando a interação entre os fatores soro e diluição aplicada foi observado variações entre as médias avaliadas. Quando comparadas as médias em maior diluição (1:2000), apenas os soros pré-imune, 2 e 4 de baixa potência não diferiram estatisticamente, os demais manifestaram médias superiores quando diluídos 1:1000. Além disso, todas as médias dos soros quando aplicada em menor diluição apresentaram diferença significativa (GRÁFICO 19).

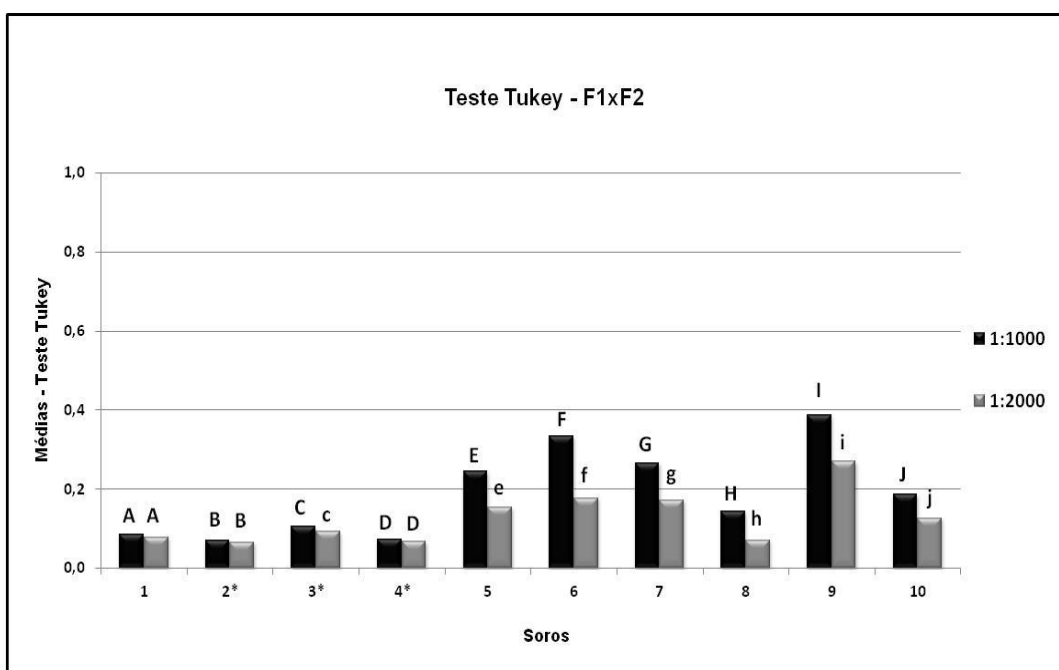


GRÁFICO 19 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1XF2 (Soros x Diluição). As colunas indicam as média obtidas pelo teste para cada diluição aplicada (1:1000 e 1:2000). As letras maiúsculas iguais indicam médias com variações não significantes entre os ensaios com diluições distintas. As letras minúsculas indicam médias inferiores e com diferenças significativas para o mesmo soro testado em ambas as diluições. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Considerada a ordem de significância das médias comparadas, quando a diluição 1:2000 foi usada observou-se médias de soros de baixa potência estatisticamente iguais e até mesmo superiores, em alguns casos, aos soros de alta potência. Contudo, quando diluídos 1:1000 todos os soros apresentaram diferença significativa, sendo possível distinguir totalmente os soros de alta e baixa potência (GRÁFICO 20).

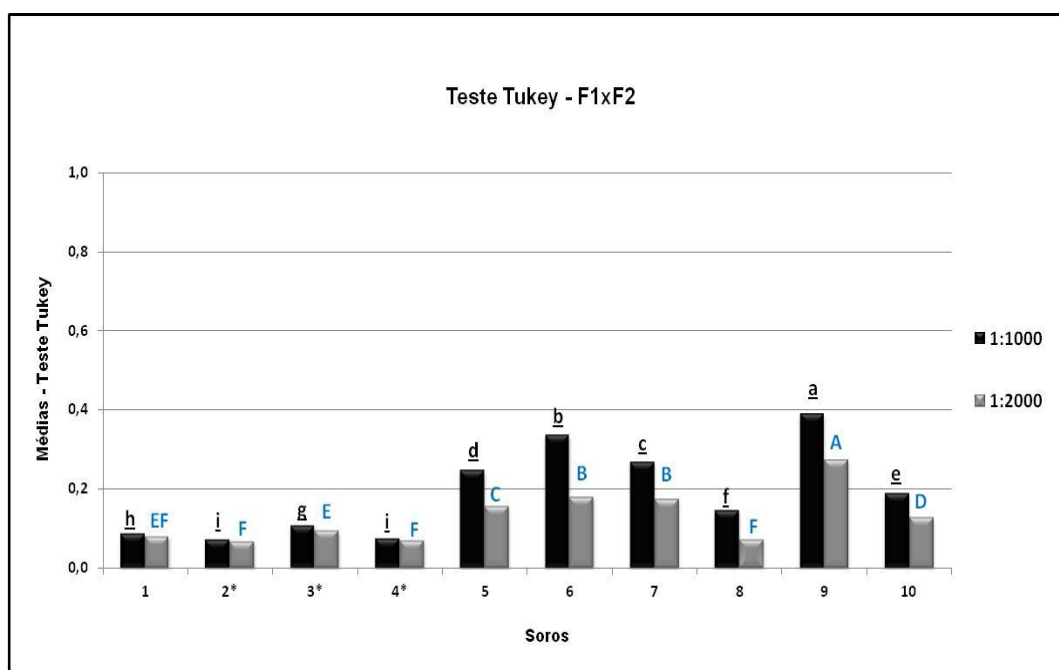


GRÁFICO 20 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E DILUIÇÃO. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1xF2 (Soros x Diluição). As colunas indicam as médias obtidas pelo teste para cada diluição analisada (1:1000 e 1:2000) e estas indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. As letras minúsculas sublinhadas representam as diferenças para médias obtidas com a diluição dos soros 1:1000, as maiúsculas em azul para diluição 1:2000. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Levando-se em conta a interação dos soros e os peptídeos testados, o peptídeo Pep5-BSA foi o melhor para todos os soros, com exceção do soro 10. Os soros 3 e 9 não apresentaram diferença significativa quando usada a combinação dos peptídeos (Pep5+7-BSA), ou seja, usar o peptídeo Pep5-BSA ou a combinação dos peptídeos para esses soros não influenciou de forma significativa em suas médias (FIGURA 15).

As reatividades dos soros 1, 2 e 4 não foram influenciadas por nenhum dos peptídeos, visto que não apresentaram diferença significativa quando comparadas em ensaios com os diferentes antígenos.

Observando atentamente a ordem de significância dos soros para cada peptídeo testado, o peptídeo Pep5-BSA conseguiu de forma significativa diferenciar todos os soros de alta e baixa potência. A combinação dos peptídeos Pep5+7-BSA e o peptídeo Pep7-BSA não conseguiram distinguir todos os soros. Para o peptídeo Pep7-BSA os soros de baixa potência 2, 4 e o pré-imune foram estatisticamente iguais ao soro 8 de alta potência. A combinação dos peptídeos, por sua vez, não diferenciou os soros 3 e 8 de baixa e alta potência, respectivamente (FIGURA 15).

A FIGURA 15 mostra a análise de interação entre os fatores 1 (soros) e 3 (peptídeos).

Teste Tukey – F1xF3									
Peptídeo 5			Peptídeo 7			Peptídeo 5+7			
Ordem de significância dos soros	1	0.0763 g A	Ordem de significância dos soros	1	0.0845 ef A	Ordem de significância dos soros	1	0.0882 f A	
	2*	0.0685 g A		2*	0.0697 f A		2*	0.0688 g A	
9	3*	0.1012 f A	9	3*	0.0892 e B	9	3*	0.1088 e A	
6	4*	0.0698 g A	10 - 7	4*	0.0677 f A	6	4*	0.0737 fgA	
7	5	0.2527 d A	7 - 5	5	0.1255 cdC	7 - 5	5	0.2232 c B	
5	6	0.3385 b A	5 - 6	6	0.1160 d C	10	6	0.3138 b B	
10 - 8	7	0.2892 c A	3* - 1	7	0.1367 bc C	8 - 3*	7	0.2343 c B	
3*	8	0.1340 e A	1 - 8 - 4* - 2*	8	0.0717 f C	1 - 4*	8	0.1192 e B	
1 - 4* - 2*	9	0.3932 a A		9	0.1902 a B	4* - 2*	9	0.4047 a A	
	10	0.1435 e B		10	0.1435 b B		10	0.1852 d A	

FIGURA 15 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E PEPTÍDEOS CARREADOS. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste Tukey considerando as interações dos fatores F1XF3 (Soros x Peptídeos). As colunas indicam as médias obtidas pelo teste para cada peptídeo testado (5 - 7 e 5+7) e estas seguidas pelas mesmas letras (minúsculas) não diferem estatisticamente entre si. As linhas comparam as médias entre os ensaios com os diferentes peptídeos, as letras maiúsculas iguais indicam médias com variações não significantes (para o mesmo soro) entre os ensaios. Em vermelho estão os soros colocados em ordem de significância de acordo com os valores das médias obtidas nos ensaios com cada peptídeo individualmente. Os retângulos destacam as médias dos soros de alta que não apresentaram diferença estatística dos soros de baixa potência. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

O valor limite para absorvância dos soros considerados como de baixa potência foi estabelecido considerando a média dos soros de baixa potência e pré-imune mais três vezes a média de seus desvios padrão. O *cut off* (0,137) estimado e os valores obtidos pelos testes de ELISA indireto com o Pep5-BSA (25 µg/mL) testado frente aos soros diluídos (1:1000), foram exibidos no GRÁFICO 21.

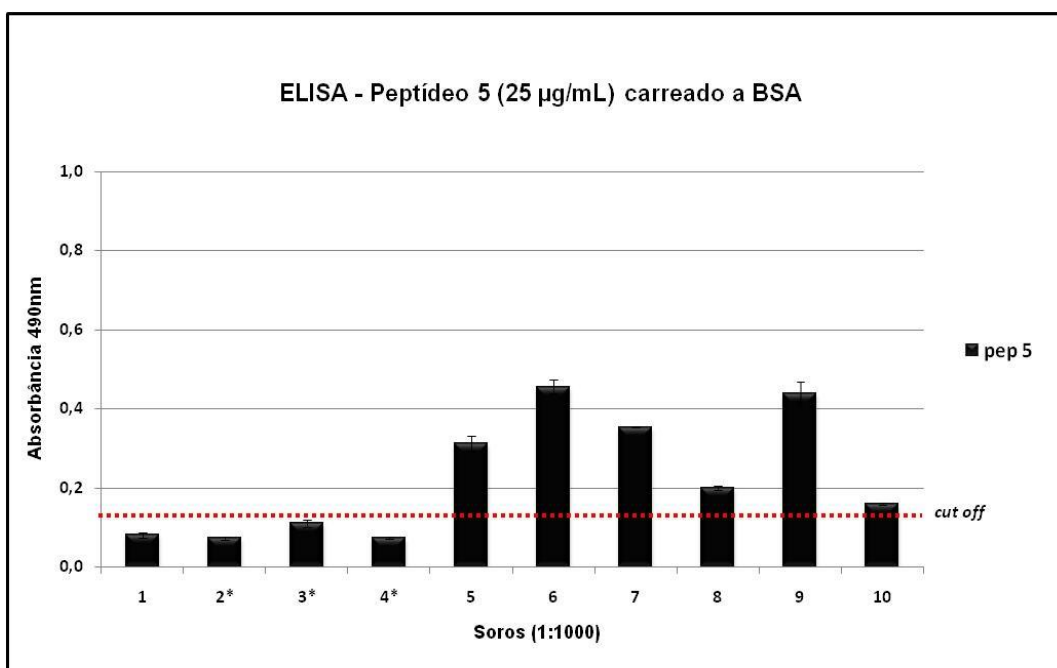


GRÁFICO 21 - REATIVIDADE DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS POR ELISA INDIRETO COM PEPTÍDEO 5 CARREADO A BSA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (25 µg/mL) de solução contendo peptídeo 5 solúvel carregado a BSA (Albumina bovina) e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos e pré-imune (soro 1) diluídos (1:1000). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorvância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. O valor do *cut off* (0,137) foi estabelecido considerando três vezes o valor da média dos desvios padrão dos soros de baixa potência e pré-imune. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

A diluição (1:1000) aplicada aos soros quando testados frente aos peptídeos que melhor diferenciou os soros ainda não havia sido aplicada em testes com os antígenos brutos. Desta forma, um ELISA nesta condição foi realizado. Os dados obtidos foram apresentados no GRÁFICO 22.

Todos os soros com exceção do pré-imune apresentaram títulos e alta reatividade quando testados frente aos antígenos brutos e a proteína dermonecrótica recombinante (LiD1). Entretanto, com as médias obtidas não foi possível diferenciar os soros de alta e baixa potência, mesmo nesta diluição (1:1000) testada.

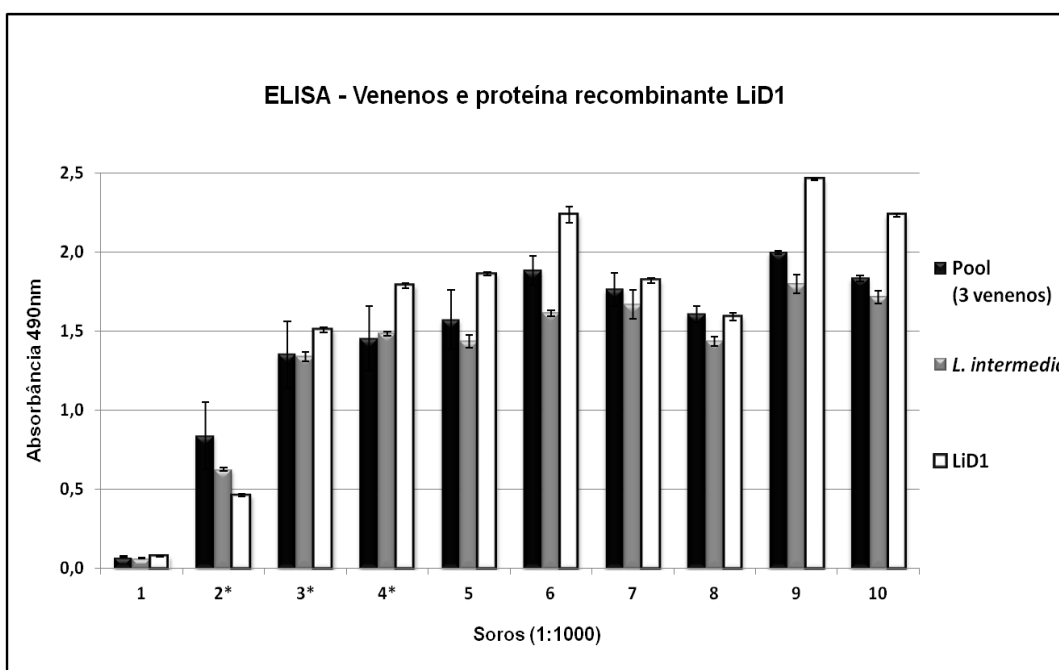


GRÁFICO 22 - TÍTULOS DOS SOROS ANTILOXOSCÉLICOS FRENTE AOS VENENOS E A PROTEÍNA RECOMBINANTE LiD1. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 μ L (2,5 μ g/mL) de antígenos e, posteriormente, incubadas com soros antiloxoscélicos e pré-imune (soro 1) diluídos (1:1000). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicatas. *Soros considerados de baixa potência após testes de soroneutralização *in vivo*. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada e consideradas significativas apenas as interações entre os fatores (teste F) ao nível de probabilidade de 1% ($p < 0,01$) e o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Para confirmar os resultados e verificar se houve diferenças significativas entre as médias dos soros de alta e baixa potência, uma análise estatística foi realizada e combinações dentro de cada grupo consideradas em esquema fatorial (10x3), sendo analisados o fator 1 (soros) na diluição 1:1000 e o fator 2 (antígenos testados).

A FIGURA 16 mostra os resultados da análise feita complementada pelo teste *Tukey*. Os dados completos das análises encontram-se em anexo.

Teste Tukey – F1xF2											
Pool– 3 venenos				L. intermedia				Proteína LiD 1			
Ordem de significância dos soros	1	0.0733 g	A	Ordem de significância dos soros	1	0.0653 f	A	Ordem de significância dossoros	1	0.0777 g	A
	2*	0.8403 f	A		2*	0.6273 e	B		2*	0.4633 f	B
9 - 6 - 10	3*	1.3540 e	AB	9 - 8 - 10 - 7 - 6	3*	1.3373 d	B	9 - 6	3*	1.5093 e	A
6 - 10 - 7	4*	1.4533 de	B	7 - 6 - 4*	4*	1.4827 bcd	A	6 - 10	4*	1.7877 cd	A
7 - 8 - 5	5	1.5687 cde	B	6 - 4* - 5	5	1.4340 cd	C	5 - 7 - 4*	5	1.8600 c	A
8 - 5 - 4*	6	1.8833 ab	B	4* - 5 - 3*	6	1.6137 abc	C	4* - 8	6	2.2340 ab	A
5 - 4* - 3*	7	1.7627 bc	A	2*	7	1.6673 ab	A	8 - 3*	7	1.8183 c	A
2*	8	1.6070 cd	B	1	8	1.7967 a	A	2*	8	1.5920 de	B
1	9	1.9953 a	B		9	1.7967 a	C	1	9	2.4583 a	A
	10	1.8340 ab	B		10	1.7143 a	B		10	2.2323 b	A

FIGURA 16 - MÉDIAS DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES SOROS E ANTÍGENOS BRUTOS. Médias obtidas pelo experimento fatorial complementado pelo teste *Tukey* considerando as interações dos fatores F1XF2 (Soros x Antígenos). As colunas indicam as médias obtidas pelo teste para cada antígeno testado (*Pool* dos 3 venenos, *L. intermedia* e *LiD1*) e estas seguidas pelas mesmas letras (minúsculas) não diferem estatisticamente entre si. As linhas comparam as médias entre os ensaios com os diferentes antígenos, as letras maiúsculas iguais indicam médias com variações não significantes (para o mesmo soro) entre os ensaios. Em vermelho estão os soros colocados em ordem de significância de acordo com os valores das médias obtidas nos ensaios com cada antígeno individualmente. Os retângulos destacam as médias dos soros de alta que não apresentaram diferença estatística dos soros de baixa potência. Foi aplicado o teste *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos foi possível apenas estabelecer uma correlação direta entre os títulos apresentados pelos métodos de ELISA e a potência neutralizante dos soros usando como antígeno o peptídeo 5 carregado a BSA. Como mostrado na FIGURA 16, os testes de ELISA usando os antígenos brutos, bem como a proteína dermonecrótica recombinante LiD1, não apresentaram resultados que correlacionasse os títulos com os testes *in vivo*, mesmo em condições similares as testadas com os peptídeos.

Com o objetivo de avaliar se anticorpos policlonais equinos anti-peptídeo 5 (previamente purificados por imunoafinidade) são capazes de reconhecer por ELISA os três venenos, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, foi preparada uma coluna de afinidade tendo o peptídeo 5 imobilizado. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com amostras de diferentes venenos (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *Tityus serrulatus*) e peptídeo Pep5-BSA com intuito de verificar o título de anticorpos.

Como resultado, os anticorpos anti-peptídeo 5 mesmo em diferentes concentrações foram capazes de reconhecer os venenos das três espécies de aranhas testados, além do peptídeo 5 carreado a BSA. Os anticorpos não apresentaram reatividade frente ao veneno de escorpião *T. serrulatus* (GRÁFICO 23) o que sugere a especificidade desses anticorpos para venenos Loxoscélicos.

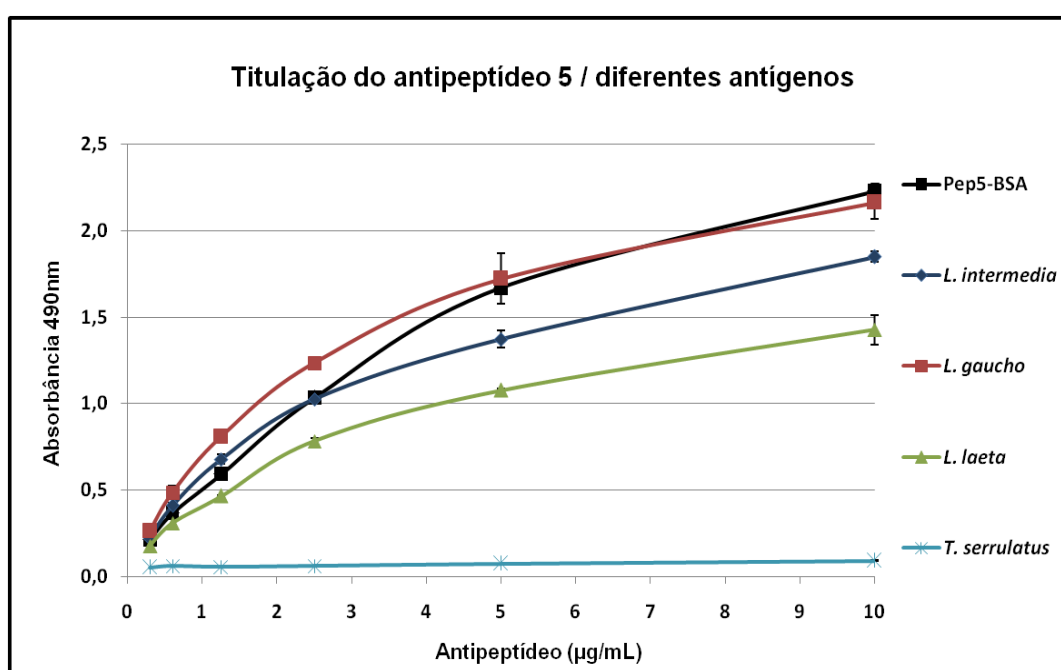


GRÁFICO 23 - TÍTULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO 5 FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (5 µg/mL) das amostras de diferentes venenos (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *Tityus serrulatus*) e peptídeo Pep5-BSA (25 µg/mL) e, posteriormente, incubadas com concentrações crescentes (0,3 - 0,6 - 1,25 - 2,5 - 5 e 10 µg/mL) de anti-peptídeo 5 (obtido a partir do *pool* de soros antiloxoscélicos de alta potência). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicata.

O teste de ELISA também foi empregado para comparar a reação cruzada dos anticorpos anti-peptídeo com antígenos de diferentes artrópodes.

Os anticorpos anti-peptídeo 5 reconheceram os venenos das três espécies de aranhas *Loxosceles* e o peptídeo Pep5-BSA, mas não apresentaram reatividade para os demais antígenos (*Apis mellifera*, peptídeo de TsNTxP, Pep7-BSA e *T. serrulatus*). O pool de soros antiloxoscélicos de alta potência foi altamente reativo com os venenos de *Loxosceles* sp. e com o Pep5-BSA, apresentaram moderada reatividade frente o veneno de escorpião e peptídeo Pep7-BSA. O mAb 12 (anticorpo monoclonal produzido contra os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) foi específico para os venenos das três espécies de aranhas, não sendo capaz de reconhecer os outros antígenos.

Os dados descritos foram apresentados no GRÁFICO 24.

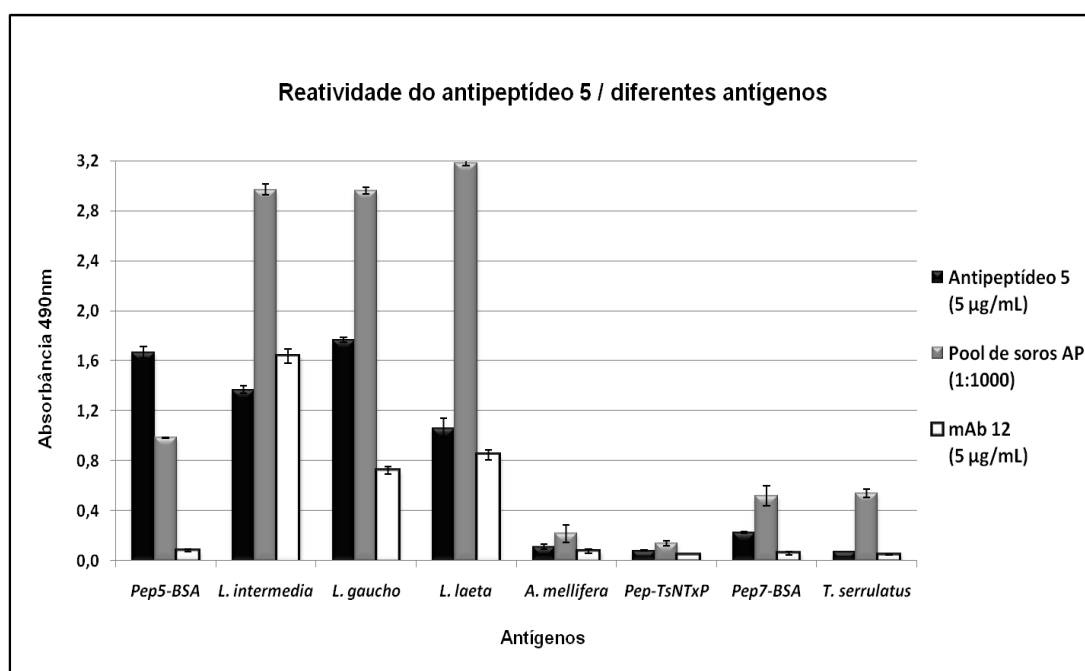


GRÁFICO 24 - REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO 5 FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL (5 µg/mL) das amostras de diferentes venenos (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta*, *Apis mellifera* e *Tityus serrulatus*) e de peptídeos (Pep5-BSA, Pep7-BSA e peptídeo central de TsNTxP) a 25 µg/mL e, posteriormente, incubadas com anti-peptídeo 5 e mAb 12 (anticorpo monoclonal produzido contra veneno de três espécies de *Loxosceles*) a 5 µg/mL e pool de soros antiloxoscélicos de alta potência diluído (1:1000). As reações foram reveladas pela adição do conjugado anti-IgG de cavalo (1:30000) marcado com peroxidase e, a seguir, do substrato específico. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicata.

Apesar da sequência do peptídeo 5 de SMase I (*L. laeta*) apresentar apenas 40% de homologia com as sequências das proteínas de *L. intermedia* e *L. gaucho* (FIGURA 17), os anticorpos anti-peptídeo 5 foram capazes de reconhecer eficientemente os venenos de todas as espécies de *Loxosceles* testadas (GRÁFICOS 23 e 24).

No entanto, como mostrado na FIGURA 17, que indica a distribuição de cargas dos resíduos aminoacídicos ao longo da sequência do peptídeo 5, a região não apresenta características semelhantes com as proteínas de *L. intermedia* e *L. gaucho*, sugerindo que a sequência reconhecida pelo anti-peptídeo 5 nos ensaios de ELISA se trata de uma região presente em outros componentes que não foram analisados nesse trabalho e estão contidos nos venenos brutos das espécies estudadas.

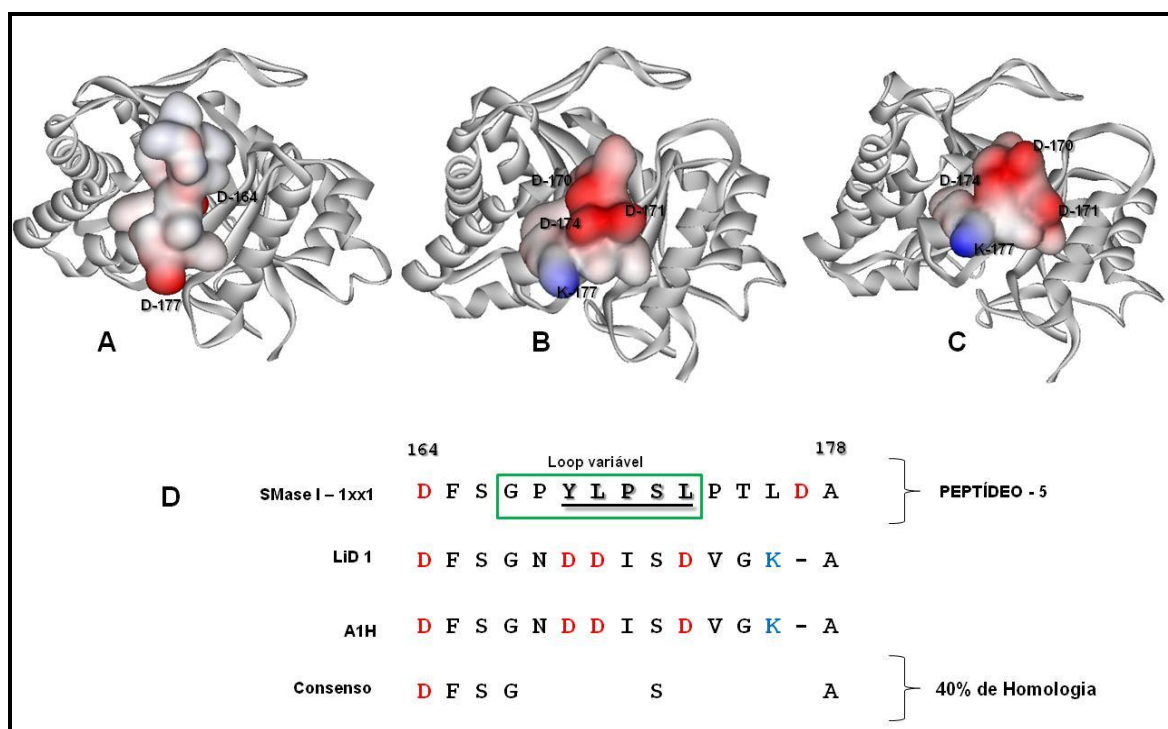


FIGURA 17 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS ANALISADAS E DISTRIBUIÇÃO DE CARGAS DOS AMINOÁCIDOS DO PEPTÍDEO 5. Obtido por modelagem molecular utilizando o programa SWISS-MODEL (PEITSCH, 1995) a partir da proteína SMase I (acesso PDB: 1XX1) (MURAKAMI *et al.*, 2005). O programa Viewer Lite foi utilizado para visualização das proteínas e distribuição das cargas aos aminoácidos da sequência analisada. (A) Estrutura tridimensional de SMase I (1xx1) - *L. laeta* (MURAKAMI *et al.*, 2005); (B) Estrutura de LiD 1 - *L. intermedia* (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002), cedida por (FELICORI *et al.*, 2006); (C) Estrutura de A1H – LoxGa - *L. gaucho* (SILVESTRE *et al.*, 2005); (D) Alinhamento da sequência do peptídeo 5 de SMase I com regiões das outras proteínas analisadas. O loop variável marcado por retângulo verde, e os resíduos conservados em SMase I sublinhados. Os resíduos eletronegativos e eletropositivos estão apresentados em vermelho e azul, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

O loxoscelismo é o termo utilizado para descrever as manifestações clínicas e lesões decorrentes de picadas por aranhas do gênero *Loxosceles*, sendo atualmente a forma mais grave de araneísmo necrótico no Brasil, principalmente nas regiões Sudeste e Sul do país (SILVEIRA, 2009), onde predominam as espécies *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, consideradas de importância médica devido à alta incidência de acidentes a elas atribuída (CHENET *et al.*, 2009).

Várias intervenções para o tratamento do envenenamento já foram propostas e testadas. De todas as terapias recomendadas, o antiveneno vem sendo citado como o único tratamento específico apontado com maior potencial de neutralização na ação dos venenos loxoscélicos (HOGAN *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2008). A competência neutralizante dos soros equinos está ligada à presença de anticorpos específicos produzidos contra os diversos componentes tóxicos presentes nos venenos (PAULI *et al.*, 2009).

A avaliação da capacidade de neutralização de antivenenos antes de sua liberação para o uso terapêutico é um passo imprescindível (THEAKSTON *et al.*, 2003), tradicionalmente analisada por testes de soroneutralização da atividade dermonecrotica empregando-se coelhos como animais de experimentação (FURLANETTO, 1961; PAULI *et al.*, 2006). O método é extremamente trabalhoso, dispendioso e de difícil padronização, além disso, o procedimento maltrata e abate um grande número de animais, tornando-se questionável devido ao progresso de leis que proíbem a produção de dor e sofrimento em animais. Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos para a avaliação da potência de antivenenos *in vitro* se apresenta cada vez mais importante e indispensável (THEAKSTON *et al.*, 2003; MARIA *et al.*, 2005).

Na busca por um método de avaliação dos soros antiloxoscélicos, o presente trabalho descreveu o uso de metodologia *in vitro* para auxiliar na qualificação dos soros de equídeos hiperimunes quanto sua capacidade neutralizante da ação tóxica de venenos loxoscélicos.

Primeiramente, o perfil eletroforético dos venenos foi avaliado e mostrou que eles possuem perfis distintos de proteínas em sua composição (FIGURA 8). Entretanto, as proteínas na faixa de massa molecular em torno de 30 - 35 kDa,

correspondentes às proteínas fosfolipases-D, estão presentes nos três venenos. Variações no perfil de expressão de proteínas entre as espécies de *L. intermedia* e *L. laeta* foram também descritas por DE OLIVEIRA *et al.*, 2005. Da mesma forma, BARBARO *et al.*, 2005, em estudo de comparação e caracterização dos aspectos de venenos de aranhas *Loxosceles* de importância médica mostrou o padrão eletroforético de venenos de cinco espécies de maior incidência nas Américas (*L. deserta*, *L. reclusa*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia*), sendo muito semelhantes com bandas incidentes em torno de 30 kDa, no entanto, muitos componentes diferentes também foram localizados em torno desta região demonstrando alta variabilidade entre os venenos.

As primeiras tentativas de se correlacionar potencial neutralizante dos soros hiperimunes antitoxinas com títulos de anticorpos em testes de ELISA, utilizando venenos brutos como antígenos, foi proposto por THEAKSTON *et al.*, 1977 para a detecção de anticorpos específicos para os venenos de serpentes.

BARBOSA *et al.*, 1995 também utilizando técnica de ELISA indireto para determinar potência neutralizante, obtiveram alta correlação com soroneutralização para venenos crotálicos, porém insignificante correlação para antivenenos botrópicos, mesmo quando utilizadas toxinas isoladas de *Bothrops jararaca*. Mesmo assim, consideraram o uso do teste de ELISA para determinar a potência de soros antiofídicos, produzidos em equinos, mais vantajoso em relação ao custo e reprodutibilidade quando comparado aos testes em camundongos. Este teste mostrou ser um método com melhor especificidade, sensibilidade, rapidez de execução, simplicidade e baixo custo.

Do mesmo modo, MARIA *et al.*, 1998 desenvolveu e padronizou teste de ELISA indireto, utilizando o veneno bruto de *B. jararaca*, os resultados mesmo com validação estatística apresentaram índice de correlação entre os níveis de anticorpos e potencial neutralizante baixo. Contudo, utilizando apenas a fração tóxica do veneno como antígeno o teste proposto foi eficaz em determinar a potência neutralizante de antivenenos botrópicos, sugerindo o uso do teste para ser usado como triagem na avaliação de soros de equinos hiperimunizados.

Neste trabalho, todos os soros antiloxoscélicos testados apresentaram reatividade contra os venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, embora com títulos variáveis. Tal reatividade era esperada tendo em vista o potencial imunogênico dos venenos (BARBARO *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). No entanto, não foi

possível estabelecer uma relação direta entre títulos apresentados pelo método de ELISA e a potência neutralizante dos soros testados, mesmo usando apenas o veneno de *L. intermedia*. Foi observado, ainda, que quando comparamos o ELISA com *L. intermedia* ou com o *pool* de venenos a utilização do *pool* foi mais eficiente para agrupar os soros de alta potência, entretanto, mesmo nessa condição não foi capaz de individualizar o soro 4, de baixa potência, dos soros 8 e 10 que são de alta potência, como mostrado na FIGURA 9. Essa melhor interação observada com o *pool* de venenos provavelmente está associada com a mistura antigênica usada no programa de imunização, que é constituída dos três venenos loxoscélicos, e portanto sofre influência dos diferentes componentes presentes nas peçonhas.

Seguindo a linha que preconiza a utilização de componentes isolados nos ensaios *in vitro*, uma possibilidade seria o uso de proteínas dermonecróticas recombinantes purificadas (ALMEIDA *et al.*, 2008). No entanto, o método de produção e purificação das proteínas recombinantes pode em alguns casos não ser estável, dificultando seu uso nos testes *in vitro*. Essa alternativa implicaria no aumento do custo do processo, já que a purificação de complexos protéicos não é fácil, e além disso, as toxinas podem sofrer mudanças conformacionais que alterariam sua funcionalidade e reconhecimento de seus epitopos por anticorpos presentes nos soros avaliados (CARVALHO *et al.*, 2011).

Ainda assim, ensaios de ELISA indireto tendo como antígeno apenas proteína dermonecrótica recombinante de *L. intermedia* (LiD1) foram realizados. Da mesma forma que com os antígenos brutos, mesmo usando apenas proteína purificada, o objetivo de correlacionar os títulos obtidos aos resultados dos testes *in vivo* não foi alcançado (GRÁFICO 11).

Assim, outra possibilidade a ser empregada, é o uso de peptídeos sintéticos. Essa alternativa parece mais promissora, tendo em vista os aspectos de produção como facilidade na síntese, alto rendimento e reprodutibilidade. Além disso, os peptídeos são moléculas quimicamente mais estáveis, e seu uso pode aumentar a especificidade dos imunoensaios em comparação aos antígenos brutos (FARIA *et al.*, 2011). No entanto, a utilização de peptídeos sintéticos em imunoensaios implica numa identificação prévia de qual sequência representa um bom candidato para o reconhecimento dos soros testados. Para isso são realizados ensaios de mapeamento de epitopos, e a técnica de imuno *SPOT* vem sendo empregada com

sucesso para toxinas, por alguns grupos (ALVARENGA *et al.*, 2002, 2003; MACHADO ÁVILA *et al.*, 2004).

A identificação de alguns epitopos peptídicos parece estar associada com regiões expostas das moléculas, que além de imunogênicas, podem estar relacionadas ao sítio ativo, ou mecanismo de ação dessas proteínas (FELICORI *et al.*, 2009; ALVARENGA *et al.*, 2010, DE MOURA *et al.*, 2011).

Na tentativa de correlacionar títulos de anticorpos frente a peptídeos sintéticos MARIA *et al.*, 2005, avaliaram a capacidade neutralizante de soros equinos anti *T. serrulatus* usando epitopos sintéticos derivados das sequências de três toxinas (TsII, TsIV e TsVII) como antígenos em placas de ELISA. Contudo, os antivenenos com elevado poder de neutralização não apresentaram a resposta esperada em ELISA, sugerindo que o reconhecimento dos epitopos das proteínas tóxicas do veneno de escorpião pelos anticorpos equinos possa estar relacionado também com a conformação das moléculas e, por isso, apresentou uma correlação abaixo do desejado.

Os venenos das aranhas *Loxosceles* apresentam uma mistura de vários componentes protéicos de composição complexa, contendo diversas toxinas. Nas diferentes espécies a presença de fosfolipases-D (30 - 35 kDa) foi associada aos principais efeitos cutâneos e sistêmicos do envenenamento. TAMBOURGI *et al.*, 2004 clonaram e expressaram as SMases-D dos venenos de *L. intermedia* e de *L. laeta* e verificaram que o soro experimental produzido frente a essas toxinas tinha capacidade de reconhecer os venenos brutos das três espécies de *Loxosceles* de importância médica no Brasil, resultado semelhante foi encontrado por ARAÚJO *et al.*, 2003 com uma proteína dermonecrótica recombinante de *L. intermedia*, a LiD1.

ALMEIDA *et al.*, 2008, ressaltaram a importância do reconhecimento dos componentes tóxicos nos venenos de *Loxosceles* por soros anti-SMases-D produzidos frente a toxinas recombinantes purificadas, apresentando títulos similares quando comparado ao soro antiaracnídico produzido contra o veneno total. Desta forma, dentre os componentes presentes nos venenos uma maior atenção têm sido dada ao grupo das proteínas dermonecróticas.

Com intuito de caracterizar imunoquimicamente as proteínas dermonecróticas FELICORI *et al.*, 2009 mapearam epitopos de LiD1 pelo método de *spot* e verificaram a reatividade de soro de cavalo anti-*L. intermedia*, sabidamente neutralizante, frente a 90 peptídeos lineares da sequência primária desta proteína.

Neste estudo, o grupo localizou seis epitopos reativos, sugerindo a eficácia do método para o mapeamento de regiões imunogênicas da toxina. Além disso, no mesmo trabalho, foi verificada a capacidade neutralizante de anticorpos produzidos quando empregados como imunógenos, os epitopos previamente selecionados.

Com isso, para realizar os ensaios de mapeamento de epitopos das proteínas dermonecróticas representativas de três espécies de *Loxosceles*, nosso grupo optou pelo método de *spot* que se baseia na síntese paralela de peptídeos em membranas de celulose (FRANK, 1992).

Como observado na FIGURA 10, os soros antiloxoscélicos reconheceram epitopos de diferentes regiões das proteínas e com base na reatividade apresentada por três soros de alta potência foram selecionados 9 peptídeos reativos (3 de cada proteína), e uma nova síntese peptídica foi realizada. Quando testados frente aos 9 peptídeos, todos os soros foram capazes de reconhecer pelo menos 2 peptídeos (FIGURA 11). Algumas dessas regiões haviam sido previamente identificadas por FELICORI *et al.*, 2009 para a proteína dermonecrótica recombinante de *L. intermedia*, confirmando sobre a imunogenicidade de algumas regiões da toxina. Para as demais toxinas nenhum trabalho descreve tal mapeamento sendo a primeira vez que essas regiões foram identificadas (FIGURA 10).

MURAKAMI *et al.*, 2005 descreveram a primeira estrutura em cristal de um membro da família de esfingomielinase-D de *L. laeta* (SMase I), verificaram e identificaram *loops* hidrofóbicos interfaciais e dobras catalíticas na mesma estrutura. Baseado na estrutura de SMase I (1xx1), foi realizada a modelagem molecular das proteínas estudadas, o que permitiu a localização das regiões escolhidas no modelo tridimensional (FIGURA 14).

Como observado na FIGURA 14, os resíduos reativos tiveram grau de exposição ao solvente bem variado, sendo o peptídeo 5 o mais exposto de todos (TABELA 9). Além disso, quando realizado o alinhamento das sequências das proteínas, com a disposição dos peptídeos, a homologia entre elas foi variável, sendo as regiões N-terminal e C-terminal das proteínas com maiores consenso (FIGURA 12). O grupo de KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002 foi o primeiro a clonar toxinas dermonecróticas do veneno de *L. intermedia*, e nesse estudo ele sugere que a porção N-terminal da proteína é altamente conservada entre as diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*, o mesmo foi observado por BARBARO *et al.*, 1996.

Dentre as regiões antigênicas mapeadas foi feita uma análise de frequência do reconhecimento dos peptídeos pelos anticorpos presentes nos diferentes soros. Foi visto que o reconhecimento de alguns epitopos era recorrente em soros alta e baixa potência, quando testados em baixa diluição. Ao aumentar a diluição, os soros de baixa potência não foram capazes de reconhecer os peptídeos, diferentemente dos soros de alta potência que permaneceram reativos, sugerindo que as condições do ensaio pode favorecer na distinção dos soros e que algumas sequências parecem ser melhor candidatas para tal diferenciação, como é o caso dos peptídeos 5 e 7 (TABELA 10) .

O peptídeo 5 foi identificado pelo mapeamento da proteína dermonecrótica Smase I (1XX1) e apresenta a sequência ¹⁶⁴DFSGPYLPSLPTLDA¹⁷⁸. Dentre os soros estudados, nenhum de baixa potência foi capaz de reconhecê-lo. Essa região foi caracterizada por MURAKAMI *et al.*, 2005 e, até o momento, identificada como sendo altamente conservada entre as toxinas dermonecróticas de *L. laeta*. Trata-se de um *loop* variável mais curto em cinco resíduos, quando comparado a outras espécies e parece ser uma região implicada na exposição do sítio ativo, como discutido por GIUSEPPE *et al.*, 2011. Parece, portanto ser uma região importante para reconhecimento de soros efetivamente neutralizantes.

Já o peptídeo 7 cuja sequência ²²EFVNLGANSIETDVS³⁶ está presente nas proteínas dermonecróticas dos venenos de *L. intermedia* e *L. gaucha*, e corresponde a uma região conservada nessas toxinas, o que sugere uma homologia estrutural e funcional das mesmas. Nesta região estão presentes aminoácidos que foram previamente caracterizados e considerados importantes na atividade dermonecrótica dos venenos de *Loxosceles* (MURAKAMI *et al.*, 2005). Os aminoácidos E32, D34 e D91 coordenam o íon de Mg⁺² que é responsável pela estabilização do sítio ativo da molécula, assim, a interação de tal região com anticorpos provavelmente interfere na ação tóxica do veneno.

Corroborando com os resultados aqui apresentados, DIAS-LOPES *et al.*, 2010 ao usarem um peptídeo sintético de 27 resíduos de aminoácidos correspondendo a região ²⁵NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGYP⁵¹ da LiD1, mostraram o potencial imunogênico e antigênico desse sítio e ainda, que a substituição de alguns resíduos por Alanina reduziram drasticamente o reconhecimento por anticorpos neutralizantes. Dos 15 aminoácidos presentes no peptídeo 7, 12 são encontrados na sequência usada por esses autores.

Tendo em vista o potencial dessas duas regiões, os peptídeos 5 e 7 foram escolhidos para síntese na forma solúvel e confecção de um teste *in vitro* no formato de ELISA. Inicialmente os peptídeos foram testados diretamente sobre a placa de ELISA, e a não obtenção de resultados levou a necessidade da utilização de uma molécula carreadora. Posteriormente, diferentes condições foram testadas, nas quais foram variadas a composição (Pep5-BSA, Pep7-BSA ou PeP5+7-BSA), as concentrações de antígenos nas placas, assim como as diluições dos soros (GRÁFICOS 15, 16, 17 e 18). A melhor condição encontrada para a qualificação dos soros esta mostrada no GRÁFICO 18, na qual a distinção entre as amostras de alta e baixa potência ficou melhor evidenciada, e ainda a análise estatística confirmou esse resultado.

De maneira interessante foi visto que o peptídeo 5 sozinho foi o melhor candidato como marcador de potencial neutralizante, pois o seu reconhecimento foi recorrente somente nos soros de alta potência. Como dito anteriormente, a sequência presente no peptídeo 5 está descrita em toxinas do veneno de *L. laeta*, que é considerado o mais imunogênico e com maior potencial dermonecrótico quando comparado com o veneno das demais espécies (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Nesse mesmo estudo, o grupo mostrou que antivenenos para *L. laeta* neutralizam melhor os efeitos dermonecróticos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, assim, mesmo sendo a qualificação *in vivo* dos soros feita com base somente na neutralização do veneno de *L. intermedia*, a utilização do veneno de *L. laeta* na imunização dos cavalos provavelmente confere melhor efeito neutralizante do SALOX.

Desta forma, a identificação e utilização dessa região (peptídeo 5) em ensaios *in vitro* parece promissora para uma triagem dos soros, no fim dos esquemas de imunização. De modo que o não reconhecimento desse epitopo sugere que dificilmente o soro testado será capaz de neutralizar eficientemente *in vivo* os efeitos dermonecróticos dos venenos. Nesse caso, um novo esquema de imunização pode ser reiniciado com intuito de melhorar a qualidade do soro, reduzindo assim o número de coelhos empregados nas sangrias de prova.

Como mostrado nos GRÁFICOS 23 e 24, os anticorpos policlonais equinos anti-peptídeo 5 foram capazes de reconhecer por ELISA os venenos de três espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) e não apresentaram reatividade com venenos de outros artrópodes, confirmando a especificidade dos anticorpos

para venenos loxoscélicos. No entanto, os resíduos que compõe o peptídeo 5 (*loop* variável) em *L. laeta* conferem a essa região um perfil neutro, enquanto que os resíduos da mesma região correspondente em *L. intermedia* e *L. gaucha* apresentaram cargas eletronegativas bem distintas, e isso pode interferir no possível reconhecimento desta região pelos anticorpos anti-peptídeo 5 (FIGURA 17). No contexto de toxinas foi visto que nas interações antígeno-anticorpo a substituição de alguns aminoácidos pode reduzir drasticamente a ligação com anticorpos, sugerindo que a presença de aminoácidos específicos confere propriedades químicas importantes no favorecimento da ligação (ALVARENGA *et al.*, 2002, DIAS-LOPES *et al.*, 2010). Assim, acredita-se que o reconhecimento dos anticorpos anti-peptídeo 5 está voltado para uma região presente também em outros componentes que não foram analisados nesse trabalho e estão contidos nos venenos brutos de todas as espécies estudadas.

A realização do presente trabalho permitiu a identificação de novas regiões que até o momento não foram descritas na literatura como sendo importantes na indução de anticorpos neutralizantes, e ainda, a proposição do emprego de uma dessas regiões/peptídeo na confecção de um ensaio *in vitro* capaz de correlacionar a potência neutralizante de soros hiperimunes antiloxoscélicos com título de anticorpos.

7 CONCLUSÕES

- Nos ensaios de ELISA em que foram empregados o *pool* de venenos, ou o veneno de *L. intermedia*, ou somente a proteína dermonecrótica recombinante LiD1 não foi possível estabelecer uma correlação entre título de anticorpos e potencial neutralizante dos soros;

- O método de *SPOT* foi eficiente no mapeamento e identificação de regiões imunogênicas de três toxinas dermonecróticas dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*;

- Alguns epitopos peptídicos encontrados correspondiam a regiões nas toxinas previamente caracterizadas como sendo importantes na imunogenicidade e toxicidade das proteínas dermonecróticas;

- Os imunoensaios realizados com as membranas contendo epitopos selecionados de cada toxina permitiram a distinção entre os soros com diferentes potenciais neutralizantes;

- A técnica empregada para o carregamento dos peptídeos solúveis assim como a molécula escolhida, a BSA, foram eficazes para a adsorção dos antígenos usados no ensaio de ELISA e favoreceram a exposição e reconhecimentos dos mesmos pelos soros;

- O teste de ELISA usando epitopos sintéticos (peptídeo 5 e/ou peptídeo 7) carregados permitiu a distinção entre os diferentes soros, correlacionando título de anticorpos ao potencial neutralizante dos soros, sendo o peptídeo 5 um candidato mais promissor para triagem dos soros;

- Anticorpos anti-peptídeo 5 foram capazes de reconhecer os venenos das três espécies de *Loxosceles* estudadas e não apresentaram reação cruzada com outras espécies de artrópodes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; ANDRADE, R.M.G.; MARCELINO, J.R.; GONDO-HIGASHI, H.; AZEVEDO, I.L.M.; HO, P.L.; VAN DEN BERG, C.; TAMBOURGI, D.V. A New Anti-loxoscelic Serum Produced Against Recombinant Sphingomyelinase D: Results of Preclinical Trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.79(3), p. 463–470, 2008.
- ALVARENGA, L.M.; DINIZ, C.R.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. **Toxicon**, v.40, p.89-95, 2002.
- ALVARENGA, L.M.; MARTINS, M.S.; MOURA, J.F.; KALAPOTHAKIS, E.; OLIVEIRA, J.C.; MANGILI, O.C.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v.42, p.725-731, 2003.
- ALVARENGA, L.M.; MOREAU, V.; FELICORI, L.; NGUYEN, C.; DUARTE, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MOLINA, F.; MARTIN-EAUCLAIRE, F.; GRANIER, C.; Design of antibody-reactive peptides from discontinuous parts of scorpion toxins. **Vaccine**, v.28, p.970-980, 2010.
- ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.37, p.627-632, 1999.
- APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into Brown spider and loxoscelism. **Invertebrate survival journal**, Italy, v.2, p. 52-158, 2005.
- ARAÚJO, S.C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L.M.; MANGILI, O.C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v.41, p.261-267, 2003.
- BARBARO, K.C.; SOUSA, M.V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **Journal of Protein Chemistry**, v.15, n.4, p.337–343, 1996.
- BARBARO, K.C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v.45, n.4, p.489-499, 2005.
- BARBOSA, C.F.; RODRIGUES, R.J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunassay. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.1077-80, 1995.
- BARNES, R.D.; RUPPERT, E.E.; FOX, R.S. **Zoologia dos invertebrados**, Editora Roca. 7 ed. São Paulo, 2005.

CABRERIZO, S.; DOCAMPO, P.C.; CARI, C.; ROZAS, M.O.; DÍAZ, M.; DE ROODT A.; CURCI, O. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de uma patologia endêmica em el país. **Archivos argentinos de pediatría**, v.107, p.152-159, 2009.

CAPELLI-PEIXOTO, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; CHAVES-MOREIRA, D.; MINOZZO, J.C.; GABARDO, J.; TEIXEIRA, K.N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ALVARENGA, L.M.; DE MOURA, J. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. **Vaccine**, v.29, p.9473-9479, 2011.

CARDOSO, J. L. C.; DE CILLO, D. M. Primeiro diagnóstico de “loxoscelismo” na casuística do Hospital Vital Brazil (HVB). **Mem. Inst. Butantan**. v.81, 1990.

CARVALHO, R.J.; CABRERA-CRESPO, J.; TANIZAKI, M.M.; GONÇALVES, V.M. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 2011.

CAVENESS, W. Insect bite complicated by fever. **Naschville J. Méd. Surg.**, v.10, p.333, 1872.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; TREVISAN, D.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim. Biophys.**, p.84–96, 2011.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; PALUDO, K.S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L; MOURA, J.F.; GREMSKI, W.; SILVEIRA, R.B.; RIBEIRO, A.S.; VEIGA, S.S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, p. 655-666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F.N.; FOGAÇA, R.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **J. Cell. Biochem.**, v.112(9), p.2529-2540, 2011.

CHENET, D.C.; WOLFART, S.C.; FERRUZZI, P.; QUADROS, R.M.; MARQUES, S.M.T. Incidence of spiders of public health importance in Curitiba, Santa Catarina. **Revista Ciência & Saúde**, v. 2, n.1, p.25-29, 2009.

CODDINGTON, J.A.; LEVI, H.W. Systematics and Evolution of Spiders (Araneae). **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v.22, p.565-592, 1991.

DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; ARAUJO, S.C.; YAZBECK, G.M.; MANGILI, O.C.; CRUZ, I.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v.44, p.273-280, 2004.

DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v.44, n.7, p.693–709, 2004.

DE MOURA, J.F.; FELICORI, L.; MOREAU, V.; GUIMARÃES, G.; DIAS-LOPES, C.; MOLINA, L.; ALVARENGA, L.M.; FERNANDES, P.; FRÉZARD, F.; RIBEIRO, R.R.; FLEURY, C.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, p.7992-1001, 2011.

DE OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, v.37, p.217-221, 1999.

DE OLIVEIRA, K.C.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; PIAZZA, R.M.; FERREIRA JR, J.M.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v.45, n.4, p.421-429, 2005.

DIAS-LOPES, C.; GUIMARÃES, G.; FELICORI, L.; FERNANDES-PEDROSA, P.; EMERY, L.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. **Toxicon**, v.55, p.481-487, 2010.

ESCOUBAS, P. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie.**, v.82, p.893-907, 2000.

FARIA, A.R.; COSTA, M.M.; GIUSTA, M.S.; GRIMALDI, G.; PENIDO, M.L.O.; GRAZZINELLI, R.T.; ANDRADE, H.M. High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **Synthetic Peptides in CVL Diagnosis**, v.5, 2011.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v.36, n.7, p.1039–1051, 1998.

FELICORI, L., ARAUJO, S.C., DE AVILA, R.A., SANCHEZ, E.F., GRANIER, C., KALAPOTHAKIS, E.F., GRANIER, C., KALAPOTHAKIS, E., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v.48, p.509–519, 2006.

FELICORI, L., FERNANDES, P.B., GIUSTA, M.S., DUARTE, C.G., KALAPOTHAKIS, E., NGUYEN, C., MOLINA, F., GRANIER, C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v.27, p.4201-4208, 2009.

FERNANDES-PEDROSA, M.F.F.; AZEVEDO I.L.M.J.; GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C.W.; RAMOS, C.R.R.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem. Bioph. Res. Commun.** v.298, p.638-645, 2002.

FERNANDES-PEDROSA, F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, L.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V.

Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, 2008.

FISCHER, M.L.; BAZILIO, S.; SANTOS, T.V.B.; GROSSKOPF, C.B. Diagnóstico da ocorrência de aranhas do gênero *Loxosceles* Heineken e Lowe, 1832 (Araneae, Sicariidae) no município de União da Vitória, Paraná. **Biotemas**, v.22, p.155-159, 2009.

FISCHER, M.L.; SCHWARTZ, R.E. Avaliação das populações de aranhas do gênero *Loxosceles* (Araneae; Sicariidae), no município de Rio Branco do Sul, Paraná, Brasil. **Ciência e Natura**, v.32 (1), p.7-23, 2010.

FOELIX, R. F. Biology of Spiders. 2nd Ed, New York/Oxford, **Oxford University Press**, 1996.

FRANK R. Spot-synthesis: na easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron**. v.48, p.9217-9232, 1992.

FURLANETTO, R.S. **Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico**. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 1961.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.**, v.304, n.4, p.261–267, 1992.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.136, p.117–174, 1967.

GIUSEPPE, P.O.; ULLAH, A.; TREVISAN, D.; GREMSKI, L.H.; WILLE, A.C.M.; CHAVES-MOREIRA, D.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; MURAKAMI, M.T.; VEIGA, S.S.; ARNI, R.K. Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011.

GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C.M.; FERRER, V.P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol. BioSyst.**, v.6, p.2403–2416, 2010.

HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann. Emerg. Med.**, v.44, n.6, p.608-624, 2004.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; CASTRO, C.S.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.40, p.1691-1699, 2002.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.; SADE, Y.B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by Brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie.**, p.1-15, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, p.265-275, 1951.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, v. 26, p.759-772, 1988.

MACHADO DE AVILA, R.A; ALVARENGA, L.M; TAVARES, C.A; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by Tityus serrulatus scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon**, v.44, p.233-241, 2004.

MACHADO, L.F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.O.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of lox necrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics.**, v.5, p.2167-2176, 2005.

MARIA, W.S.; CAMBUY, M.O.; COSTA, J.O.; VELARD, D.T.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antithropic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. **Toxicon**, v.36, p.1433-1439, 1998.

MARIA, W.S.; VELARDE, D.T.; ALVARENGA, L.M.; NGUYEN, C.; VILLARD, S.; GRANIER, C. Localization of epitopes in the toxins of Tityus serrulatus scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. **Toxicon**, v.46, p.210-217, 2005.

MARQUES DA SILVA, E. **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heineken* & Lowe, 1832, no período de 1993 a 2000.** Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2002.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Rev. Soc. Bras. de Med. Tropical**, v.38(4), p.331-335, 2005.

MEIER, J.; STOCKER, K. On the significance of animal experiments in toxinology. **Toxicon**, v.27, n. 1, p.91-104, 1989.

MERRIFIELD, R.D. Peptide synthesis: The synthesis of a tetrapeptide. **J. AM. Chem. Soc.**, v.85, p.2149, 1963.

MIZUGUCHI, K.; DEANE, C.M.; BLUNDELL, T.L; JOHNSON, M.S.; OVERINGTON, J. HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. *Protein Sci*, v.7, n.11, Nov, p.2469-71. 1998.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural Basis for Metal-Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **J Biol Chem**, v. 280, p.13658-13658, 2005.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C.W; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M. DE F.; OKAMOTO, C.K.; TAMBURGI, D.V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **J. Invest. Dermatol.**, v.127, n.6, 1410-8, 2007.

PAULI, I.; PUKA, J.; GABERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in Loxoscelism treatment. **Toxicon**, v.48, n.2, p.123-137, 2006.

PAULI, I.; MINOZZO, J.C.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the Brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon*, v.53, p.660-671, 2009.

PEITSCH, M. C. Protein modeling by E-mail Bio/Technology. v.13, p.658-660, 1995.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History, 2007. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>. Acesso em: 25/01/2011.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 8.5. American Museum of Natural History, 2008. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>. Acesso em: 28/03/2011.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 10.0. American Museum of Natural History, 2009. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>. Acesso em: 28/08/2011.

REES, RS; NANNEY, LB; YATES, RA; KING, LE. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: The inciting mechanism? **J. Invest. Dermatol.**, v.83, p.270-275, 1984.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING, L.E. Necrotic arachdism. **J. Am. Acad Dermatol.**, v.44, p.61-573, 2001.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. Disponível em: <http://www.assistat.com/indexp.html#ref>. Acesso em: 05/04/2012.

SILVEIRA, A.L. First synanthropic record of *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the municipality of Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. de Med. Tropical**, v.42(6), p.723-726, 2009.

Sistema Nacional De Notificação de Agravos - SINAN, Ministério Da Saúde, BRASIL, 2010.

SESA - Secretaria Estadual de Saúde Ambiental do Paraná. Acidentes por animais peçonhentos. Dados do Paraná. Disponível em <http://www.saude.pr.gov.br> Acesso em: 30/03/2010.

SILVESTRE, F.G.; CASTRO, C.S.; DE MOURA, J.F.; GIUSTA, M.S.; DE MARIA, M.; ÁLVARESC, F.C.F.; LOBATO, É.S.S.; ASSIS, R A, GONÇALVES, L.A.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Characterization of the venom from the brazilian brown spider *Loxosceles similes* moenkhaus, 1898 (araneae, sicariidae). **Toxicon**, 2005.

SWANSON, D.L.; VETER, R.S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v.24, p.213-221, 2006.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; Von EICKSTEDT, V.R.D.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; DIAS DA SILVA, W. Incorporation of a 35-Kilodalton purified

protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.**, v.155, p.4459-466, 1995.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W.; MORGAN, B.P.; DE ARAUJO, P.S.; ALVES, E.W.; SA SILVA, W.D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.251, n.1, p.366-373, 1998.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v.95, n.2, p.683-691, 2000.

TAMBOURGI, D.V.; DE SOUZA, M.; BILLINGTON, S.J.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; SONGER, J.G.; VAN DEN BERG, C.W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology**, v.107, p.93-101, 2002.

TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES-DEANDRADE, R.M.; FERRACINI, M.; PAIXAO-CAVALCANTE, D.; MORGAN, B.P.; RUSHMERE, N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol. Immunol.**, v.41, p.831-840, 2004.

TAMBOURGI, D.V.; CAVALCANTI, D.P.; DE ANDRADE, R.M.G.; FERNANDES-PEDROSA, F.M.; MAGNOLI, F.; MORGAN, P.B.; VAN DEN BERG, W.C. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **J. Invest. Dermatol.**, v.124, p.725-731, 2005.

TAMBOURGI, D.V.; DE ANDRADE, R.M.G.; VAN DEN BERG, W.C. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v.56, p.1113-1119, 2010.

TAVARES, F.L. **Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente pelo veneno loxoscélico em coelhos.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia. São Paulo, 2007.

THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M.J.; REID, H.A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. **The Lancet**, v.24, p.639-641, 1977.

THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, v.61(6), p.949-956, 1983.

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v.41, p.541-557, 2003.

VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.38, n.6, p.825–839, 2000.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International journal of dermatology**, United States, v.37, p.481-496, 1998.

WILKINS, M.R.; LINDSKOG, I.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J.C.; HOCHSTRASSER, D.F.; APPEL, R.D. *Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool*. **Electrophoresis**, v.18(3-4), p.403-408, 1997.

ANEXOS

ANEXO 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DE ELISA COM O POOL DE VENENOS

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.24/01/2011

=====

Arquivo resultado

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator1 (F1)	9	40.94017	4.54891	762.8167 **
Fator2 (F2)	7	31.17067	4.45295	746.7257 **
Int. FlxF2	63	6.42695	0.10202	17.1071 **
Tratamentos	79	78.53779	0.99415	166.7111 **
Resíduo	160	0.95413	0.00596	
Total	239	79.49192		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)
 ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
9	160	2.5156	762.8167	<0.001
7	160	2.7485	746.7258	<0.001
63	160	1.5914	17.1071	<0.001
79	160	1.5413	166.7111	<0.001

Fator 1 = Soro
 Fator 2 = Diluição

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator1

1	0.07846	f
2	0.35575	e
3	0.95692	d
4	0.96742	d
5	1.12525	c
6	1.30583	b
7	1.35158	b
8	1.01429	d
9	1.44833	a
10	1.11242	c
DMS1 =	0.07148	

Médias do fator2

1	1.45897	a
2	1.35027	b
3	1.25297	c
4	1.09360	d
5	0.93377	e
6	0.73503	f
7	0.55117	g
8	0.39723	h

DMS2 = 0.06119

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Médias Fator 1 x Fator 2

Fator 2			
Fator 1	1	2	3
1	0.1200 eA	0.0930 fA	0.0847 eA
2	0.7627 dA	0.6227 eAB	0.5047 dBC
3	1.5320 cA	1.4413 cdAB	1.3230 bcB
4	1.4883 cA	1.4100 dA	1.3227 bcA
5	1.7357 bA	1.6197 bcAB	1.5060 abB
6	1.8263 abA	1.6573 abAB	1.5880 aBC
7	1.9893 aA	1.8323 aAB	1.7050 aBC
8	1.5093 cA	1.4130 dAB	1.2963 cBC
9	1.6800 bcA	1.6403 abcAB	1.6110 aAB
10	1.9460 aA	1.7730 abAB	1.5883 aB

Continuação

Médias Fator 1 x Fator 2

Fator 2			
Fator 1	4	5	6
1	0.0750 eA	0.0690 eA	0.0630 dA
2	0.3480 dCD	0.2337 eDE	0.1553 dDE
3	1.1050 cC	0.8777 dD	0.6437 cE
4	1.1103 cB	0.9047 dC	0.6947 cD
5	1.3063 bcC	1.1467 bcC	0.7967 cD
6	1.4450 abCD	1.3390 abD	1.1117 bE
7	1.5530 aC	1.3313 abD	1.0710 bE
8	1.1307 cCD	0.9650 cdD	0.7603 cE
9	1.5757 aABC	1.4813 aBC	1.3993 aC
10	1.2870 bcC	0.9893 cdD	0.6547 cE

Continuação

Médias Fator 1 x Fator 2

Fator 2		
Fator 1	7	8
1	0.0643 fA	0.0587 fA

2	0.1200 fE	0.0990 efE
3	0.4350 eF	0.2977 deF
4	0.4767 deE	0.3320 dE
5	0.5373 deE	0.3537 cdE
6	0.8610 bF	0.6183 bG
7	0.7840 bcF	0.5467 bcG
8	0.6433 cdE	0.3963 cdF
9	1.1840 aD	1.0150 aD
10	0.4060 eF	0.2550 defF

DMS para colunas = 0.2022 DMS para linhas = 0.1935
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

PARA FATOR 1 FATOR 2...

As médias seguidas pela mesma letra não diferem
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.97163

CV% = 7.94776

DADOS

.093	.118	.149
.074	.088	.117
.074	.086	.094
.069	.078	.078
.062	.074	.071
.060	.074	.055
.060	.073	.060
.059	.067	.050
.873	.737	.678
.730	.575	.563
.556	.527	.431
.397	.320	.327
.268	.216	.217
.183	.135	.148
.151	.103	.106
.119	.089	.089
1.568	1.423	1.605
1.485	1.371	1.468
1.415	1.220	1.334
1.177	1.014	1.124
.964	.786	.883
.705	.578	.648
.492	.380	.433
.345	.261	.287
1.593	1.370	1.502
1.483	1.359	1.388
1.404	1.301	1.263
1.188	1.072	1.071
.991	.873	.850
.758	.678	.648
.538	.478	.414
.379	.340	.277
1.520	1.747	1.940
1.422	1.635	1.802
1.418	1.469	1.631
1.159	1.310	1.450
.980	1.010	1.450

.727	.748	.915
.478	.489	.645
.298	.321	.442
1.783	1.841	1.855
1.670	1.588	1.714
1.613	1.577	1.574
1.503	1.378	1.454
1.371	1.277	1.369
1.114	1.086	1.135
.835	.865	.883
.594	.600	.661
1.975	1.997	1.996
1.850	1.825	1.822
1.703	1.693	1.719
1.542	1.596	1.521
1.315	1.351	1.328
1.057	1.072	1.084
.772	.776	.804
.557	.539	.544
1.560	1.433	1.535
1.468	1.317	1.454
1.294	1.242	1.353
1.153	1.065	1.174
1.020	.900	.975
.832	.727	.722
.883	.529	.518
.469	.349	.371
1.717	1.612	1.711
1.690	1.554	1.677
1.681	1.513	1.639
1.666	1.457	1.604
1.546	1.404	1.494
1.427	1.355	1.416
1.256	1.113	1.183
1.108	.973	.964
1.999	1.926	1.913
1.803	1.766	1.750
1.661	1.549	1.555
1.360	1.266	1.235
1.035	.974	.959
.682	.646	.636
.404	.408	.406
.261	.251	.253

SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola
 F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade
 S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 DMS = Diferença mínima significativa

NOTA

Quando o F fica muito próximo mas não atinge a significância

poderá haver diferença significativa entre a maior e a menor média. Também poderá não haver diferença significativa entre médias quando o F é significativo porém muito próximo da não significância. Isso é limitação da aplicação conjunta dos testes F e de Tukey, citada por Frederico Pimentel Gomes no seu livro; Curso de EXTATÍSTICA EXPERIMENTAL (ver o item 3.3)

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78, 2002.

Silva, F. de A. S. e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

ANEXO 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DE ELISA COM VENENO DE *L. intermedia*

```
=====
ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage http://www.assistat.com
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/01/2011
=====
Arquivo Resultado
```

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator1 (F1)	9	26.57202	2.95245	1845.6447 **
Fator2 (F2)	5	17.43976	3.48795	2180.4017 **
Int. FlxF2	45	3.38662	0.07526	47.0457 **
Tratamentos	59	47.39840	0.80336	502.2011 **
Resíduo	120	0.19196	0.00160	
Total	179	47.59037		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)
 ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
9	120	2.5586	1845.645	<0.001
5	120	3.1735	2180.402	<0.001
45	120	1.7271	47.0457	<0.001
59	120	1.6593	502.2011	<0.001

Fator 1 = Soro
 Fator 2 = Diluição

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator1

1	0.06250	h
2	0.22517	g
3	0.76344	f
4	0.94717	d
5	0.89272	e
6	0.80367	f
7	1.00633	c
8	0.76839	f
9	1.09694	b
10	1.46228	a
DMS1 =	0.04299	

Médias do fator2

1	1.25530	a
2	1.06917	b
3	0.90903	c
4	0.71460	d
5	0.52203	e
6	0.34703	f

DMS2 = 0.02994

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Médias Fator 1 x Fator 2

Fator 1	Fator 2		
	1	2	3
1	0.0760 gA	0.0660 fA	0.0647 fA
2	0.4963 fA	0.3037 eB	0.2237 eBC
3	1.3877 dA	1.1167 cdB	0.8467 dC
4	1.5497 cA	1.3480 bB	1.1097 cC
5	1.3993 dA	1.2113 cB	1.0957 cC
6	1.3120 deA	1.1223 cdB	0.8760 dC
7	1.6563 bA	1.3940 bB	1.1567 bcC
8	1.2773 eA	1.0557 dB	0.8563 dC
9	1.6107 bcA	1.3750 bB	1.2500 bC
10	1.7877 aA	1.6990 aAB	1.6110 aB

Continuação

Médias Fator 1 x Fator 2

Fator 1	Fator 2		
	4	5	6
1	0.0580 eA	0.0593 fA	0.0510 eA
2	0.1453 eCD	0.1067 fD	0.0753 eD
3	0.6023 dD	0.3897 eE	0.2377 dF
4	0.8120 cD	0.5380 cdE	0.3257 cdF
5	0.8323 cD	0.5260 cdE	0.2917 cdF
6	0.6923 dD	0.4957 cdE	0.3237 cdF
7	0.8577 cD	0.5950 cE	0.3783 cF
8	0.6500 dD	0.4563 deE	0.3147 cdF
9	1.0007 bD	0.7853 bE	0.5600 bF
10	1.4953 aC	1.2683 aD	0.9123 aE

DMS para colunas = 0.1053
Classific.c/letras minúsculasDMS para linhas = 0.0947
Classific.c/letras maiúsculas

PARA FATOR 1 FATOR 2...

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.80286

CV% = 4.98169

DADOS

```

-----
.067 .080 .081
.050 .078 .070
.050 .074 .070
.048 .071 .055
.045 .073 .060
.042 .061 .050
.471 .466 .552
.283 .301 .327
.268 .197 .206
.176 .126 .134
.119 .096 .105
.067 .070 .089
1.411 1.357 1.395
1.108 1.133 1.109
.855 .848 .837
.568 .582 .657
.367 .380 .422
.233 .229 .251
1.551 1.541 1.557
1.372 1.310 1.362
1.094 1.145 1.090
.801 .796 .839
.529 .528 .557
.301 .339 .337
1.465 1.354 1.379
1.270 1.224 1.140
1.097 1.082 1.108
.801 .842 .854
.492 .540 .546
.280 .296 .299
1.379 1.231 1.326
1.042 1.169 1.156
.872 .871 .885
.704 .686 .687
.487 .494 .506
.319 .311 .341
1.622 1.671 1.676
1.390 1.377 1.415
1.114 1.146 1.210
.848 .819 .906
.588 .586 .611
.386 .355 .394
1.230 1.296 1.306
1.003 1.071 1.093
.861 .863 .845
.636 .630 .684
.471 .447 .451
.339 .285 .320
1.586 1.588 1.658
1.402 1.394 1.329
1.226 1.257 1.267
.999 .968 1.035
.809 .772 .775
.563 .570 .547
1.700 1.818 1.845
1.561 1.794 1.742
1.597 1.528 1.708

```

1.452	1.574	1.460
1.349	1.290	1.166
.941	.927	.869

SIGLAS E ABREVIATÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola
 F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade
 S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 DMS = Diferença mínima significativa

NOTA

Quando o F fica muito próximo mas não atinge a significância poderá haver diferença significativa entre a maior e a menor média. Também poderá não haver diferença significativa entre médias quando o F é significativo porém muito próximo da não significância. Isso é limitação da aplicação conjunta dos testes F e de Tukey, citada por Frederico Pimentel Gomes no seu livro; Curso de EXTATÍSTICA EXPERIMENTAL(ver o item 3.3)

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

ANEXO 3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES DE ELISA COM O POOL DE VENENOS E DE *L. intermedia*

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.16/02/2011

=====

Arquivo Resultado

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	
Fator1 (F1)	9	47.34502	5.26056	1527.7761	**
Fator2 (F2)	5	33.41074	6.68215	1940.6358	**
Fator3 (F3)	1	0.05380	0.05380	15.6253	**
Int. F1xF2	45	5.98633	0.13303	38.6346	**
Int. F1xF3	9	5.54669	0.61630	178.9862	**
Int. F2xF3	5	0.02120	0.00424	1.2313	ns
Int.F1x2x3	45	0.88754	0.01972	5.7280	**
Tratamentos	119	93.25132	0.78362	227.5810	**
Resíduo	240	0.82639	0.00344		
Total	359	94.07771			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Fator 1 = Soro

Fator 2 = Diluição

Fator 3 = Veneno

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator1

1	0.06581	i
2	0.23431	h
3	0.77189	g
4	0.87700	e
5	0.91692	e
6	0.98200	d
7	1.08575	c
8	0.81686	f
9	1.23733	a
10	1.16283	b

DMS1 = 0.04410

Médias do fator2

1	1.25408	a
2	1.08138	b
3	0.92140	c
4	0.72482	d
5	0.53660	e
6	0.37213	f

DMS2 = 0.03076

Médias do fator3

1	0.80284	b
2	0.82729	a

DMS3 = 0.01217

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Médias Fator 1 x Fator 2

Fator 2			
Fator 1	1	2	3

1	0.0803 eA	0.0705 eA	0.0668 hA
2	0.5005 dA	0.3258 dB	0.2287 gBC
3	1.3553 bcA	1.1108 cB	0.8622 fC
4	1.4362 bA	1.2292 bB	1.0072 deC
5	1.4527 bA	1.2588 bB	1.1212 cC
6	1.4495 bA	1.2837 bB	1.1075 cdC
7	1.6807 aA	1.4735 aB	1.2440 bC
8	1.2868 cA	1.0932 cB	0.9107 efC
9	1.6108 aA	1.4753 aB	1.3657 aC
10	1.6880 aA	1.4930 aB	1.3002 abC

Continuação

Médias Fator 1 x Fator 2

Fator 2			
Fator 1	4	5	6

1	0.0605 hA	0.0618 fA	0.0548 fA
2	0.1503 hCD	0.1133 fD	0.0872 fD
3	0.6230 gD	0.4123 eE	0.2677 eF
4	0.7533 efD	0.5073 deE	0.3288 eF
5	0.8145 deD	0.5317 dE	0.3227 eF
6	0.9020 cdD	0.6783 cE	0.4710 cF
7	0.9643 cD	0.6895 cE	0.4625 cdF
8	0.7052 fgD	0.5498 dE	0.3555 deF
9	1.2000 aD	0.9847 aE	0.7875 aF
10	1.0750 bD	0.8372 bE	0.5837 bF

DMS para colunas = 0.1080 DMS para linhas = 0.0973
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Médias Fator 1 x Fator 3

Fator 3		
Fator 1	-----	
	1	2

1	0.0625 gA	0.0691 gA
2	0.2252 fA	0.2434 fA
3	0.7634 eA	0.7803 eA
4	0.9472 cdA	0.8068 deB
5	0.8927 dB	0.9411 cA
6	0.8035 eB	1.1605 bA
7	1.0063 cB	1.1652 bA
8	0.7684 eB	0.8653 dA
9	1.0969 bB	1.3777 aA
10	1.4623 aA	0.8634 dB

DMS para colunas = 0.0624 DMS para linhas = 0.0385
 Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Médias Fator 2 x Fator 3		

Fator 3		
Fator 2	-----	
	1	2

1	1.2552	1.2530
2	1.0692	1.0936
3	0.9090	0.9338
4	0.7146	0.7350
5	0.5220	0.5512
6	0.3470	0.3972

Não foi aplicado o teste de comparação de médias
 por que o F de interação não foi significativo

PARA FATOR 1 FATOR 2, FATOR 3...

As médias seguidas pela mesma letra não diferem
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.81507

CV% = 7.19932

DADOS		

.067	.080	.081
.074	.086	.094
.050	.078	.070
.069	.078	.078
.050	.074	.070
.062	.074	.071
.048	.071	.055
.060	.074	.055
.045	.073	.060
.060	.073	.060
.042	.061	.050
.059	.067	.050
.471	.466	.552
.556	.527	.431
.283	.301	.327
.397	.320	.327

.268	.197	.206
.268	.216	.217
.176	.126	.134
.183	.135	.148
.119	.096	.105
.151	.103	.106
.067	.070	.089
.119	.089	.089
1.411	1.357	1.395
1.415	1.220	1.334
1.108	1.133	1.109
1.177	1.014	1.124
.855	.848	.837
.964	.786	.883
.568	.582	.657
.705	.578	.648
.367	.380	.422
.492	.380	.433
.233	.229	.251
.345	.261	.287
1.551	1.541	1.557
1.404	1.301	1.263
1.372	1.310	1.362
1.188	1.072	1.071
1.094	1.145	1.090
.991	.873	.850
.801	.796	.839
.758	.678	.648
.529	.528	.557
.538	.478	.414
.301	.339	.337
.379	.340	.277
1.465	1.354	1.379
1.418	1.469	1.631
1.270	1.224	1.140
1.159	1.310	1.450
1.097	1.082	1.108
.980	1.010	1.450
.801	.842	.854
.727	.748	.915
.492	.540	.546
.478	.489	.645
.280	.296	.299
.298	.321	.442
1.376	1.231	1.326
1.613	1.577	1.574
1.042	1.169	1.156
1.503	1.378	1.454
.872	.871	.885
1.371	1.277	1.369
.704	.686	.687
1.114	1.086	1.135
.487	.494	.506
.835	.865	.883
.319	.311	.341
.594	.600	.661
1.622	1.671	1.676
1.703	1.693	1.719

1.390	1.377	1.415
1.542	1.596	1.521
1.114	1.146	1.210
1.315	1.351	1.328
.848	.819	.906
1.057	1.072	1.084
.588	.586	.611
.772	.776	.804
.386	.355	.394
.557	.539	.544
1.230	1.296	1.306
1.294	1.242	1.353
1.003	1.071	1.093
1.153	1.065	1.174
.861	.863	.845
1.020	.900	.975
.636	.630	.684
.832	.727	.722
.471	.447	.451
.883	.529	.518
.339	.285	.320
.469	.349	.371
1.586	1.588	1.658
1.681	1.513	1.639
1.402	1.394	1.329
1.666	1.457	1.604
1.226	1.257	1.267
1.546	1.404	1.494
.999	.968	1.035
1.427	1.355	1.416
.809	.772	.775
1.256	1.113	1.183
.563	.570	.547
1.108	.973	.964
1.700	1.818	1.845
1.661	1.549	1.555
1.561	1.794	1.742
1.360	1.266	1.235
1.597	1.528	1.708
1.035	.974	.959
1.452	1.574	1.460
.682	.646	.636
1.349	1.290	1.166
.404	.408	.406
.941	.927	.869
.261	.251	.253

SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola
 F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade
 S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 DMS = Diferença mínima significativa

NOTA

Quando o F fica muito próximo mas não atinge a significância poderá haver diferença significativa entre a maior e a menor média. Também poderá não haver diferença significativa entre médias quando o F é significativo porém muito próximo da não significância. Isso é limitação da aplicação conjunta dos testes F e de Tukey, citada por Frederico Pimentel Gomes no seu livro; Curso de EXTATÍSTICA EXPERIMENTAL (ver o item 3.3)

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

ANEXO 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES DE ELISA COM PROTEÍNA DERMONECRÓTICA RECOMBINANTES *LiD1*

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.26/03/2012

=====

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator1 (F1)	9	23.37093	2.59677	2715.3634 **
Fator2 (F2)	3	31.96877	10.65626	11142.9252 **
Int. F1xF2	27	6.77866	0.25106	262.5273 **
Tratamentos	39	62.11836	1.59278	1665.5201 **
Resíduo	80	0.07651	0.00096	
Total	119	62.19487		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
9	80	2.6385	2715.364	<0.001
3	80	4.0375	11142.92	<0.001
27	80	1.9836	262.5273	<0.001
39	80	1.8567	1665.52	<0.001

Fator 1 = Soros

Fator 2 = Diluição

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator1

1	0.06908	h
2	0.20442	g
3	0.66317	f
4	0.90517	d
5	0.91200	d
6	1.22033	c
7	0.91833	d
8	0.79333	e
9	1.57567	a
10	1.30608	b

DMS1 = 0.04111

Médias do fator2			
	1	1.60277	a
	2	1.05073	b
	3	0.50860	c
	4	0.26493	d

DMS2 =		0.02097	
MÉDIAS DE INTERAÇÃO			
Médias Fator 1 x Fator 2			

	Fator 2		
Fator 1	1	2	3

1	0.0777 fA	0.0567 hA	0.0910 fA
2	0.4633 eA	0.1993 gB	0.0943 fC
3	1.5093 dA	0.7100 fB	0.2977 eC
4	1.7877 cA	1.0897 dB	0.5013 dC
5	1.8573 cA	1.1430 dB	0.4467 dC
6	2.2340 bA	1.5947 cB	0.6960 cC
7	1.8183 cA	1.1263 dB	0.5077 dC
8	1.5893 dA	0.9277 eB	0.4420 dC
9	2.4583 aA	1.9480 aB	1.1690 aC
10	2.2323 bA	1.7120 bB	0.8403 bC

Continuação			
Médias Fator 1 x Fator 2			

	Fator 2		
Fator 1	4		

	1	0.0510	gA
	2	0.0607	fgC
	3	0.1357	efD
	4	0.2420	dD
	5	0.2010	deD
	6	0.3567	cD
	7	0.2210	dD
	8	0.2143	deD
	9	0.7273	aD
	10	0.4397	bD

DMS para colunas =	0.0822	DMS para linhas =	0.0663
Classific.c/letras minúsculas		Classific.c/letras maiúsculas	

PARA FATOR 1 FATOR 2...

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.85676

CV% = 3.60948

DADOS

.075	.077	.081
.053	.060	.057
.086	.090	.097
.052	.054	.047
.456	.469	.465
.175	.182	.241
.088	.090	.105
.060	.063	.059
1.521	1.516	1.491
.729	.709	.692
.308	.298	.287
.125	.137	.145
1.800	1.792	1.771
1.107	1.110	1.052
.519	.521	.464
.231	.240	.255
1.847	1.865	1.860
1.177	1.159	1.093
.457	.439	.444
.206	.192	.205
2.184	2.233	2.285
1.664	1.576	1.544
.722	.679	.687
.361	.286	.423
1.827	1.802	1.826
1.137	1.153	1.089
.496	.524	.503
.190	.182	.291
1.566	1.590	1.612
.940	.954	.889
.435	.451	.440
.211	.191	.241
2.454	2.461	2.460
1.988	1.956	1.900
1.181	1.204	1.122
.668	.712	.802
2.218	2.236	2.243
1.736	1.711	1.689
.864	.849	.808
.394	.442	.483

SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola
 F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade
 S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 DMS = Diferença mínima significativa

NOTA

Quando o F fica muito próximo mas não atinge a significância poderá haver diferença significativa entre a maior e a menor

média. Também poderá não haver diferença significativa entre médias quando o F é significativo porém muito próximo da não significância. Isso é limitação da aplicação conjunta dos testes F e de Tukey, citada por Frederico Pimentel Gomes no seu livro; Curso de EXTATÍSTICA EXPERIMENTAL (ver o item 3.3)

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78, 2002.

Silva, F. de A. S. e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

ANEXO 5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES DE ELISA COM OS DIFERENTES PEPTÍDEOS CARREADOS

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.04/03/2011

=====

Arquivo Resultado

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator1 (F1)	9	1.29069	0.14341	1753.3018 **
Fator2 (F2)	1	0.17466	0.17466	2135.3290 **
Fator3 (F3)	2	0.22496	0.11248	1375.1744 **
Int. F1xF2	9	0.11719	0.01302	159.1877 **
Int. F1xF3	18	0.27441	0.01525	186.3831 **
Int. F2xF3	2	0.02247	0.01124	137.3818 **
Int. F1x2x3	18	0.03550	0.00197	24.1094 **
Tratamentos	59	2.13988	0.03627	443.4189 **
Resíduo	120	0.00982	0.00008	
Total	179	2.14970		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
9	120	2.5586	1753.302	<0.001
1	120	6.8509	2135.329	<0.001
9	120	2.5586	159.1877	<0.001
2	120	4.7865	1375.174	<0.001
18	120	2.0869	186.3831	<0.001
2	120	4.7865	137.3818	<0.001
18	120	2.0869	24.1094	<0.001
59	120	1.6593	443.4189	<0.001

Fator 1 = Soros

Fator 2 = Diluição dos Soros (1:1000-1:2000)

Fator 3 = Peptídeos (5-7-5+7)

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator1

1	0.08300	g
2	0.06900	h
3	0.09972	f
4	0.07039	h
5	0.20044	d
6	0.25611	b
7	0.22006	c

8	0.10828	f
9	0.32933	a
10	0.15739	e

DMS1 = 0.00972

Médias do fator2

1	0.19052	a
2	0.12822	b

DMS2 = 0.00267

Médias do fator3

1	0.18668	a
2	0.10945	c
3	0.18198	b

DMS3 = 0.00392

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Médias Fator 1 x Fator 2

		Fator 2	
Fator 1	1	2	
1	0.0868 hA	0.0792 efA	
2	0.0716 iA	0.0664 fA	
3	0.1069 gA	0.0926 eB	
4	0.0726 iA	0.0682 fA	
5	0.2454 dA	0.1554 cB	
6	0.3354 bA	0.1768 bB	
7	0.2670 cA	0.1731 bB	
8	0.1444 fA	0.0721 fB	
9	0.3877 aA	0.2710 aB	
10	0.1874 eA	0.1273 dB	

DMS para colunas = 0.0137 DMS para linhas = 0.0084
 Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Médias Fator 1 x Fator 3

		Fator 3		
Fator 1	1	2	3	
1	0.0763 gA	0.0845 efA	0.0882 fA	
2	0.0685 gA	0.0697 fA	0.0688 gA	
3	0.1012 fAB	0.0892 eB	0.1088 eA	
4	0.0698 gA	0.0677 fA	0.0737 fgA	
5	0.2527 dA	0.1255 cdC	0.2232 cB	
6	0.3385 bA	0.1160 dC	0.3138 bB	
7	0.2892 cA	0.1367 bcC	0.2343 cB	
8	0.1340 eA	0.0717 fC	0.1192 eB	
9	0.3932 aA	0.1902 aB	0.4047 aA	

10	0.1435 eB	0.1435 bB	0.1852 dA

DMS para colunas =	0.0168	DMS para linhas =	0.0124
Classific.c/letras minúsculas		Classific.c/letras maiúsculas	
Médias Fator 2 x Fator 3			

	Fator 3		
Fator 2	-----		
	1	2	3

1	0.2260 aA	0.1248 aB	0.2208 aA
2	0.1474 bA	0.0941 bB	0.1432 bA

DMS para colunas =	0.0046	DMS para linhas =	0.0055
Classific.c/letras minúsculas		Classific.c/letras maiúsculas	

PARA FATOR 1 FATOR 2, FATOR 3...

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.15937 CV% = 5.67478

DADOS		

.076	.079	.089
.089	.090	.090
.090	.090	.088
.068	.069	.077
.077	.082	.079
.090	.088	.083
.069	.074	.077
.071	.067	.074
.071	.071	.070
.061	.061	.069
.068	.069	.069
.068	.067	.066
.102	.110	.119
.092	.088	.088
.125	.118	.120
.088	.094	.094
.088	.087	.092
.094	.096	.100
.072	.072	.077
.069	.068	.068
.080	.075	.072
.060	.066	.072
.065	.064	.072
.061	.086	.068
.335	.302	.302
.147	.149	.150
.286	.266	.272
.184	.180	.213
.096	.106	.105
.166	.158	.191
.476	.443	.448
.141	.150	.156
.416	.400	.389

.211	.216	.237
.078	.085	.086
.237	.210	.231
.353	.355	.352
.178	.172	.150
.286	.274	.283
.214	.231	.230
.108	.103	.109
.201	.195	.167
.205	.195	.199
.073	.073	.074
.172	.156	.153
.068	.071	.066
.070	.071	.069
.085	.077	.072
.441	.410	.467
.237	.226	.217
.492	.492	.507
.346	.362	.333
.154	.149	.158
.323	.307	.307
.158	.161	.161
.176	.163	.158
.237	.236	.237
.123	.124	.134
.124	.119	.121
.134	.133	.134

SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola
 F.V. = Fonte de variação G.L. = Graus de liberdade
 S.Q. = Soma de quadrado Q.M. = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 DMS = Diferença mínima significativa

NOTA

Quando o F fica muito próximo mas não atinge a significância poderá haver diferença significativa entre a maior e a menor média. Também poderá não haver diferença significativa entre médias quando o F é significativo porém muito próximo da não significância. Isso é limitação da aplicação conjunta dos testes F e de Tukey, citada por Frederico Pimentel Gomes no seu livro; Curso de EXTATÍSTICA EXPERIMENTAL (ver o item 3.3)

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS

ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

ANEXO 6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES DE ELISA COM OS DIFERENTES ANTÍGENOS (POOL DE VENENOS, *L. intermedia* E Lid1)

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.05/03/2012

=====

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1 (F1)	9	32.13325	3.57036	508.1288 **
Fator2 (F2)	2	0.96973	0.48486	69.0051 **
Int. FlxF2	18	1.61557	0.08975	12.7737 **
Tratamentos	29	34.71855	1.19719	170.3826 **
Resíduo	60	0.42159	0.00703	
Total	89	35.14014		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
9	60	2.7185	508.1288	<0.001
2	60	4.9774	69.0051	<0.001
18	60	2.2493	12.7737	<0.001
29	60	2.0405	170.3826	<0.001

Fator 1 = Soros

Fator 2 = Pool, Li e Lid1

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	0.07211	g
2	0.64367	f
3	1.40022	e
4	1.57456	d
5	1.62089	cd
6	1.91033	b
7	1.74944	c
8	1.66522	cd
9	2.08344	a
10	1.92689	b

dms = 0.12993

Médias do fator 2

1	1.43720	b
2	1.35353	c
3	1.60330	a

dms =	0.05203	

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

			B			
A	-----					
	B1		B2		B3	

A1	0.0733	gA	0.0653	fA	0.0777	gA
A2	0.8403	fA	0.6273	eB	0.4633	fB
A3	1.3540	eAB	1.3373	dB	1.5093	eA
A4	1.4533	deB	1.4827	bcdB	1.7877	cdA
A5	1.5687	cdeB	1.4340	cdB	1.8600	cA
A6	1.8833	abB	1.6137	abcC	2.2340	abA
A7	1.7627	bcA	1.6673	abA	1.8183	cA
A8	1.6070	cdB	1.7967	aA	1.5920	deB
A9	1.9953	aB	1.7967	aC	2.4583	aA
A10	1.8340	abB	1.7143	aB	2.2323	bA

dms para colunas = 0.2250 dms para linhas = 0.1645
 Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 1.46468

CV% = 5.72

Ponto médio = 1.26250

DADOS

.071	.073	.076
.064	.065	.067
.075	.077	.081
.945	.597	.979
.614	.635	.633
.456	.469	.465
1.363	1.140	1.559
1.322	1.373	1.317
1.521	1.516	1.491
1.520	1.224	1.616
1.470	1.495	1.483
1.800	1.792	1.771
1.600	1.370	1.736
1.472	1.441	1.389
1.847	1.865	1.868
1.939	1.777	1.934
1.624	1.591	1.626
2.184	2.233	2.285

1.845	1.648	1.795
1.771	1.616	1.615
1.827	1.802	1.826
1.664	1.561	1.596
1.863	1.757	1.770
1.566	1.598	1.612
1.985	1.999	2.002
1.863	1.757	1.770
2.454	2.461	2.460
1.815	1.833	1.854
1.757	1.675	1.711
2.218	2.236	2.243

SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola
 FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade
 SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio
 F = Estatística do teste F MG = Média geral
 CV% = Coeficiente de variação em %
 dms = Diferença mínima significativa

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.